

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA AGRÍCOLA

IMPACTO DEL PROCESAMIENTO SOBRE LA PARED CELULAR Y LAS PROPIEDADES HIPOGLUCÉMICAS Y TECNOFUNCIONALES DE LEGUMINOSAS



THAISE RACHEL SARMENTO
MADRID 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Agrícola



TESIS DOCTORAL

**Impacto del procesamiento sobre la pared celular y
las propiedades hipoglucémicas y tecnofuncionales
de leguminosas**

THAISE RACHEL SARMENTO

Madrid, 2012

Directoras: Dra. María Ángeles Martín Cabrejas

Dra. Rosa María Esteban Álvarez

Dra. Yolanda Aguilera Gutiérrez



Facultad de Ciencias
Departamento de Química Agrícola

MARÍA ÁNGELES MARTÍN-CABREJAS, PROFESORA TITULAR, ROSA MARÍA ESTEBAN ÁLVAREZ, CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA AGRÍCOLA, Y YOLANDA AGUILERA GUTIÉRREZ PROFESORA AYUDANTE DOCTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

CERTIFICAN:

Que D^a Thaise Rachel Sarmiento, ha realizado bajo nuestra dirección y en este Departamento el trabajo que lleva por título "Impacto del procesamiento sobre la pared celular y las propiedades hipoglucémicas y tecnofuncionales de leguminosas" que constituye su Memoria de Tesis Doctoral. Dicho trabajo reúne las condiciones necesarias para su presentación y defensa.

Y para que conste a los efectos oportunos firmamos el presente certificado en Madrid, a 11 de Octubre de 2012.

Fdo: María Ángeles Martín-Cabrejas

Fdo: Rosa María Esteban Álvarez

Fdo: Yolanda Aguilera Gutiérrez



Facultad de Ciencias
Departamento de Química Agrícola

RAMÓN O. CARPENA RUIZ, CATEDRÁTICO Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA AGRÍCOLA, DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: "Impacto del procesamiento sobre la pared celular y las propiedades hipoglucémicas y tecnofuncionales de leguminosas" se ha realizado en este Departamento bajo la dirección de las Dras. María Ángeles Martín-Cabrejas, Rosa María Esteban Álvarez y Yolanda Aguilera Gutiérrez, y que constituye la Memoria que presenta D^a Thaise Rachel Sarmento para optar al Grado de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente certificado en Madrid, a
11 de Octubre de 2012.

Fdo. Ramón O. Carpena Ruiz

AGRADECIMIENTOS

En estos casi 6 años en Madrid he aprendido muchas cosas, de las cuales debo tanto a las personas que aquí conocí. ¿Y cómo podría nombrar en tan poco espacio a todas ellas sin olvidarme de nadie?! Imposible. Decidí no nombrar a nadie y, simplemente contar situaciones donde estoy segura que las personas que leerán estas líneas se reconocerán.

Etapas 1: La llegada

Prefiero empezar por el día en que llegué a Madrid (24 de diciembre de 2006). Mi primer vuelo internacional, sabiendo solamente decir: "gracias, adiós y buenos días". Sí, ¡era Navidad! y creo que fue por esto que el policía de inmigración estaba tan simpático conmigo, lo mismo le dio no entender nada de lo que le hablaba. En esta parte tengo que agradecer la paciencia de tantas personas que me enseñaron, me corrigieron, me explicaron el idioma español, que admito que es más fácil que el portugués, y del que cada día estoy más enamorada.

Sí, era invierno, y ¡qué frío hacía! Acostumbrarse a un clima tan diferente del tropical, es complicado, se sufre un poco. Muchas personas que conocí me ayudaron a adaptarme a las condiciones climáticas, a las costumbres de los españoles, a conocer y a moverme en la ciudad de Madrid.

Etapas 2: La pasta

Bien que me avisaron en Brasil: No seas tan inconsciente, tienes que saber cuánto necesitarás para pagar el Máster en Química Agrícola. No escuché a nadie y llegué aquí con 300 euros que me dejaron de todo corazón. Y cómo echo de menos mi moto, que vendí para pagar el billete de avión. Sí que fui impulsiva, pero vine con muchas ganas de aprender y vivir algo nuevo. En el primer mes me enteré de que con esta cantidad no duraría mucho, pero mucha gente me ayudó, y conseguí trabajo para poder mantenerme y pagar mis estudios durante dos increíbles años.

Etapas 3: ¡Dios, qué hago aquí!

Y yo que pensé que la Universidad sería la parte más fácil, más fácil que trabajar cuidando de una niña y limpiando casas. Creía que ahí me sentiría en mi ambiente, pero qué irónica es la vida. Química Agrícola, la química de la agricultura, pero para mí, Ingeniera de Montes, era demasiada química; me sentí un pez fuera del agua. Todos sabían demasiado y yo muy poco. Algunas veces me desesperé, pero mucha gente me ayudó, en las prácticas, en los trabajos que tenía que escribir en español, en las presentaciones hablando en mi idioma preferido: Portuñol. Recibí mucha ayuda y mucha caña. Jamás me olvidaré de esta frase: NO HAY EXCUSAS. Él tenía razón. De verdad cuando queremos y soñamos algo no hay excusas, no se miden esfuerzos en realizarlo. Cuántos compañeros míos me ayudaron con el máster, cuántos profesores me explicaban con toda la paciencia del mundo cosas que para muchos eran lógicas. Entre el trabajo y los estudios conseguí el récord de hacer un máster en 4 largos cursos. ¡Santo Cielo! creo que algunos pensaban: "y ésta aún sigue aquí!" Sí, seguí ahí hasta terminar el máster y meterme en el Doctorado. "¡Vaya cabezota soy!"

Etapas 4: ¿Y por qué no alimentos?

Ah, aquel señor tan simpático que me enseñaba sobre alimentos. Era un mundo nuevo y me parecía todo tan interesante. Y yo, con mi manía de probar cosas nuevas, ya no me bastaba la química de suelos, ahora meterme con química de alimentos. Pues creo que fueron aquellas dulces palabras que me hicieron presentarme en el laboratorio de alimentos, llena de ganas de aprender, en pleno agosto. Vaya, ¡aún no me había enterado de que ese mes no se trabaja!

Etapas 5: Pasándolo bien

Entre trabajar y estudiar qué bien lo he pasado. Es impresionante que en momentos en que uno NO tiene mucho (financieramente) se valore tanto todo. Fue una época muy intensa y gratificante, cuantas personas estaban a mi lado ayudándome, cuidándome, preocupándose de mí y pasando buenos y malos ratos a mi lado. Muchos consejos escuché y uno de ellos fue apuntarme a la beca del MAEC-AECID, consejo que me fue dado por una persona que vino de tan lejos, y a la que nunca

más he visto, pero que me llenó de esperanzas. Y por una especie de milagro fui perseguida (porque fue algo que vino hasta mi sin más) por esta beca y en noviembre de 2008 recibí mi primera mensualidad. ¡Madre mía! nunca había ganado tanto, sí que había ganado cuantía parecida trabajando como socorrista, pero por dedicarme a la universidad, no. ¡Qué bien! Me sentí tan cuidada, amparada. Dejé los otros trabajos y me dediqué exclusivamente a los estudios: terminar las asignaturas del máster, y seguir con los ensayos de laboratorio del Doctorado. ¡Todo un lujo!

... y claro, tuve que dejar los encantos de mi abuelita española (PROGRAMA VIVE Y CONVIVE) porque ahora ya podría pagarme un alquiler y disfrutar de otras cosas también, de los encantos de viajar, de conocer más Madrid y Europa, ¡bellos momentos! Y qué bien traer a mi mamá para conocer el viejo mundo, para ella un viaje que jamás había imaginado, qué bien tenerla aquí conmigo por 20 cortitos pero muy intensos días. También tuve que dejar mi beca en el Servicio de Deportes, ¡qué placer trabajar con aquella gente encantadora! Pero en este momento tenía una beca de verdad. Sí, esta beca fue un lindo regalo, sin ella no podría haber conseguido seguir con todo lo que se pide un Doctorado. Gracias.

Etapas 6: En prácticas

Todo lo que para vosotros, sí vosotros de química (o los que estén acostumbrados a trabajar en laboratorio) que estáis leyendo estas líneas... todo que lo para vosotros fue fácil de hacer en prácticas en el máster a mí me costó muchísimo tiempo, y mucha paciencia de quien me explicaba cómo realizar todos los ensayos de laboratorio. Muchas personas me enseñaron mucho sobre cómo trabajar en un laboratorio, pero tengo que decir que dos grandes personas fueron más que compañeros de trabajo, fueron hermanos y ángeles en mi vida aquí en España. A estos debo toda esta Tesis. Ellos me enseñaron desde los cálculos para preparar disoluciones, hasta cómo montar los cables del HPLC (mi querido HPLC, ¡cuántos momentos pasamos juntos!), no tengo palabras para explicar cómo mis compañeros fueron tan importantes en mi vida dentro y fuera del laboratorio. Ellos de alguna forma me mostraron que yo era capaz de mucho más de lo que imaginaba. Aprendí a verme de igual a igual con mis compis químicos. ¡Y viva la química!

Y qué puedo decir de las personas que me pusieron como responsable de toda la parte de laboratorio de un proyecto de leguminosas, y que al mismo tiempo eran responsables por mí. Me guiaron en la ejecución de esta Tesis, me quitaron dudas, me propusieron ideas nuevas, y porqué no decir que me estresaron y yo a ellas. Sí porque no solo de momentos bonitos se hace una Tesis. ¡Cuántos problemas pueden surgir en un ambiente que se cree tan controlado como es un laboratorio! Y aún tuve que enseñar a preciosas niñas que iban y venían de nuestro laboratorio, gracias mis pequeñas. Cuántas personas envueltas en ayudarme con protocolos, aparatos, accidentes, cuánta energía que me fue encaminando para que hoy presente en estas pocas páginas la vivencia de estos 4 años de ensayos de laboratorio.

Etapas 7: Enamorada

Fue en mi proyecto de leguminosas. Así como algunas veces ocurre con los enamoramientos, un día me di cuenta de que me gustaba un montón mi trabajo en el laboratorio y también mis semillas de leguminosas: mi familia más cercana Leguminosae. Me enamoré de estas semillas que tanto trabajo me daban, cuánto me costó aprender sobre ellas, pero cuando me di cuenta de que cada día mejoraban más mis criterios sobre cómo realizar un ensayo o de cómo estudiar un protocolo, y también cómo dar vueltas para resolver problemas, me sentí muy capaz de más y más, y vi cómo el trabajo que antes me daba miedo, ahora me fascinaba. Agradezco a tantas personas que me escucharon tanto en mis momentos de desespero como de alegría, y que me ayudaron en el arte apasionante de la investigación, en el que por ahora aún estoy gateando.

Etapas 8: El adiós! Vuelvo llena

Si comparo mi vida hace casi 6 años y ahora que estoy para presentar esta Tesis, me doy cuenta de que vuelvo a casa llena de todo. Aprendí mucho en este tiempo, viví tantas cosas, gané mucho en

todo. Para aquellos que aún no se dejaron llevar por el "destino, un impulso, o lo que sea" os lo aconsejo, es una experiencia enriquecedora. Cambié mucho en estos años, en otras cosas creo que no cambiaré nunca, pero me llevo muchas experiencias de España. ¡Qué país! ¡Qué gente! Por qué no puse esta parte en la Etapa 7... vuelvo enamorada de España, amo este país, su gente, su idioma, su dieta mediterránea, su día a día. Sólo imaginar que me voy, me duele, es como dejar mi propio país. Qué lugares encantadores conocí, qué gente tan amable, apasionada y receptiva encontré. ¡Qué sabores tan ricos!, ¡qué mezclas tan curiosas probé! ¡Cuánta tranquilidad y paz viví aquí! Echaré mucho de menos todo. Pero no podría irme sin llevarme algo. Vuelvo llena, de amigos (ah! amigos os amo mogollón, quiero que vengáis todos a visitarme, ¡me hará mucha ilusión!), de vivencias, de experiencias, y también de ganas de volver. A mis amigos y tantas personas que conocí, ¡me habéis llenado la vida! ¡Cuántos recuerdos! ¡Qué buenos momentos pasamos juntos!

Es verdad que aquí llegué con poco en mis dos maletas, y que ahora tengo amigos y una linda familia. Sí, ¡una familia! Una familia que me aceptó con tanto amabilidad. Qué bien lo he pasado con ellos, cuánto me enseñaron, cuánto os echaré de menos. No hay cómo agradecer todo lo que hicieron por mí. Esta familia, mi familia española la llevaré conmigo, en mi corazón y a mi lado en el avión. "Entre tantos outros, entre tantos anos, entre tantos lugares, que sorte a nossa heim! entre tantas coisas - esse encontro." (adaptación de Aínda Bem). Hasta en esto tengo que agradecer a mis estudios en la UAM. ¡Fíjate!

Gracias también a mi familia brasileña y mis amigos, que estuvieron a mi lado en todo este tiempo, animándome a distancia. Cómo es capaz de transmitir tanto amor internet. Si no fuera por todas las conexiones de MSN y las llamadas de Skype, la vida aquí habría sido mucho más difícil. Porque, aunque lo pases bien donde estás, siempre se echa de menos a la familia, en todos los momentos, da igual, siempre se piensa. Si estuviesen aquí...!

Y el futuro: ¿Qué estará por venir?

Ahora vuelvo. Vuelvo a Brasil con un máster más y también con un Doctorado en una universidad española. Vuelvo una profesional diferenciada de mis compañeros de carrera, Ingenieros de Montes. Vuelvo con conocimientos en química, en alimentos, hablando español (aunque me queda mucho por aprender), pero comprendo y me hago comprender bien. Vuelvo llena de esperanzas y con muchas ganas de seguir como investigadora. ¿Pero será así? A ver qué me deparará el destino. Sí el destino, o como se llame: Dios, energía, Padre del Universo, en fin... Pero que para mí tiene un sentido especial. Mi Dios es especial, es diferente, es solamente mío, porque lo imagino diferente de todo lo que he escuchado hasta ahora. No se comparte, claro, porque es algo personal e intransferible. Esa energía en mi vida, es particularmente mía, y que no tiene nada que ver con lo que se escucharía dentro de una religión, nada que ver. Es algo para mí, que cada uno decide creer, y cómo creer o no creer. En fin, a esta energía que siento tengo que agradecer todo lo que he vivido hasta hoy, porque soy lo que soy por todas las experiencias que viví hasta ahora. Que por más que intento controlar, ¡el destino cambia muchas cosas! ¡Y por qué no! Más divertido así.

Ahora sí me despido de vosotros que habéis tenido tanta paciencia (o curiosidad) por seguir leyendo estas líneas hasta el final. Os dejo para que disfrutéis de este trabajo que me costó tanta dedicación, y que me ha dado tanto placer verlo terminarlo.

¡Gracias y que lo disfrutes!

A

mis padres, mis hermanos y mi abuela,

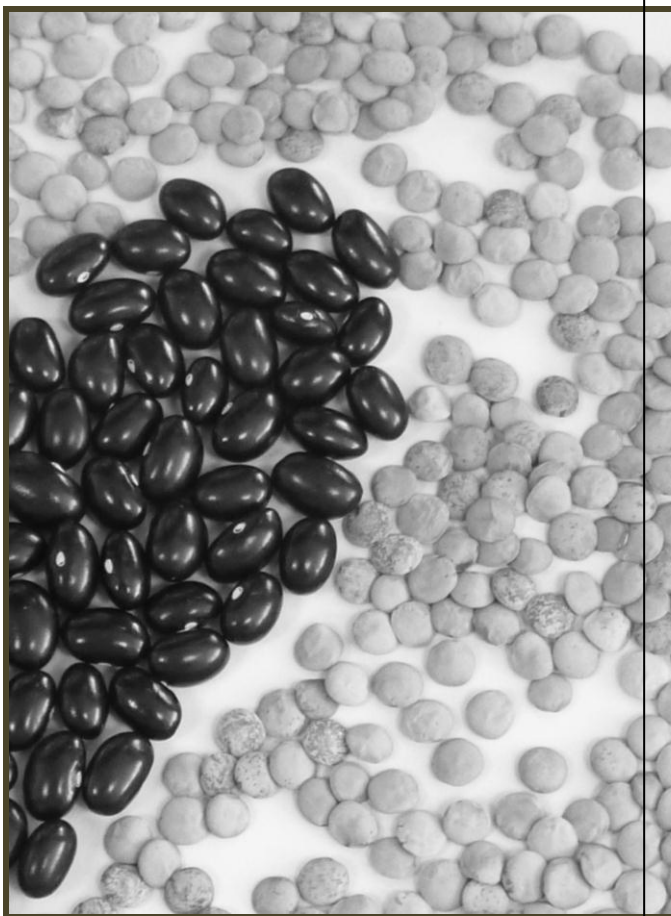
Andrés Barrera Vilarmau y familia,

Derly Sarmiento Melo, y

Arlete Sarmiento

dedico

ÍNDICE



ÍNDICE GENERAL

I INTRODUCCIÓN	1
II OBJETIVOS	7
III ANTECEDENTES	13
III.1 IMPORTANCIA DE LAS LEGUMINOSAS EN LA ALIMENTACIÓN	14
III.1.1 DESCRIPCIÓN DE LAS LEGUMINOSAS	18
JUDÍA DE TOLOSA	19
LENTEJA DE LA ARMUÑA	20
III.2 COMPONENTES PRINCIPALES Y CARACTERÍSTICAS DE LAS LEGUMINOSAS	21
III.2.1 PROTEINAS	22
III.2.2 CARBOHIDRATOS	24
III.2.2.1 Almidón	25
III.2.2.2 Fibra alimentaria y Pared Celular	29
Pared Celular	30
Clasificación de la Fibra Alimentaria	34
Componentes de la Fibra Alimentaria	36
Propiedades Físico-Químicas de la Fibra Alimentaria	39
Efectos fisiológicos	42
Adición de fibra a alimentos	44
III.2.3 OTROS COMPONENTES IMPORTANTES	46
III.3 PROPIEDADES TECNOFUNCIONALES	49
III.4 PROCESAMIENTOS DE LAS SEMILLAS DE LEGUMINOSAS	52
III.4.1 INFLUENCIA DEL PROCESAMIENTO TÉRMICO SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LAS LEGUMINOSAS	52
III.4.2 GERMINACIÓN	57
Influencia de la germinación en los componentes de harinas de leguminosas	60
Capítulo 1 - ESTUDIO INICIAL DE CARACTERIZACIÓN DE LEGUMINOSAS	65
1.1 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO	66
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	66
1.3 METODOLOGÍA	66
MUESTRAS	66
PROCESAMIENTOS	66
Cocción	66
Germinación	67
Preparación de las harinas	67
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y FÍSICAS	67
COMPOSICIÓN QUÍMICA	68
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	70
1.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y FÍSICAS	71
COMPOSICIÓN QUÍMICA	72
Humedad	72
Cenizas	73
Grasas	74
Proteínas	75

Carbohidratos	76
Capítulo 2 - EFECTO DE LOS PROCESAMIENTOS SOBRE LA FRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS COMPLEJOS EN LEGUMINOSAS	79
2.1 RELEVANCIA DEL ESTUDIO	80
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	81
2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS	81
DETERMINACIÓN DE FIBRA ALIMENTARIA	81
HIDRÓLISIS DE LOS COMPONENTES DE LA FIBRA ALIMENTARIA	82
DETERMINACIÓN DE AZÚCARES NEUTROS Y ÁCIDOS URÓNICOS	84
CUANTIFICACIÓN DEL ALMIDÓN	84
2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	85
FIBRA ALIMENTARIA: CUANTIFICACIÓN ENZIMÁTICA-GRAVIMÉTRICA	86
FIBRA ALIMENTARIA: CUANTIFICACIÓN ENZIMÁTICA-QUÍMICA	88
Fibra insoluble (FI)	88
Fibra soluble (FS)	97
Fibra total (FT)	100
CUANTIFICACIÓN DE ALMIDÓN	103
2.5 CONCLUSIONES PARCIALES	107
Capítulo 3 - INFLUENCIA DEL PROCESAMIENTO SOBRE LA PARED CELULAR DE LEGUMINOSAS	111
3.1 RELEVANCIA DEL ESTUDIO	112
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	113
3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS	113
PREPARACIÓN DEL RESIDUO LIBRE DE ALMIDÓN (RLA) Y CUANTIFICACIÓN DE SUS COMPONENTES	113
Preparación del RLA	114
Cuantificación de azúcares neutros y ácidos urónicos	117
Determinación del grado de metilesterificación del RLA	117
FRACCIONAMIENTO DE LOS POLÍMEROS DE LA PARED CELULAR - MÉTODO QUÍMICO NO DEGRADATIVO	117
Cuantificación de los componentes del RLA	123
3.4 RESULTADOS Y DISCUSIONES	123
COMPOSICIÓN DEL RESIDUO LIBRE DE ALMIDÓN (RLA)	123
Rendimiento del RLA	124
Composición del residuo libre de almidón (RLA)	124
Estudio del grado de metilesterificación (GM) de los polisacáridos pécticos	134
FRACCIONAMIENTO SECUENCIAL NO DEGRADATIVO DEL MATERIAL DE LA PARED CELULAR	136
Composición de la pared celular	136
Fracción CDTA	138
Fracción Na ₂ CO ₃	141
Fracciones KOH 1M y KOH 4M	144
Fracción Residuo (α -celulosa)	150
3.5 CONCLUSIONES PARCIALES	154
Capítulo 4 - ESTUDIO DE LA FRACCIÓN PROTEICA EN LA HARINA DE LEGUMINOSA PROCESADA	157

4.1	IMPORTANCIA DEL ESTUDIO	158
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	161
4.3	MÉTODOS ANALÍTICOS	161
	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	161
	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	161
	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	161
	ELECTROFORESIS	162
	Electroforesis unidimensional	162
	Electroforesis bidimensional (2D-SDS-PAGE)	163
	Tinción de geles SDS-PAGE	164
4.4	RESULTADOS Y DISCUSIONES	165
	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	165
	ELECTROFORESIS UNIDIMENSIONAL	166
	ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL	168
4.5	CONCLUSIONES PARCIALES	170
Capítulo 5 - INFLUENCIA DE DIFERENTES PROCESOS SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE HARINAS DE LEGUMINOSAS		173
5.1	IMPORTANCIA DEL ESTUDIO	174
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	175
5.3	METODOLOGÍA	175
	EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS	175
	CUANTIFICACIÓN DE LOS POLIFENOLES TOTALES	175
	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	176
	Método DPPH	176
	Método FRAP	178
5.4	RESULTADOS Y DISCUSIONES	179
	COMPUESTOS FENÓLICOS	179
	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	180
	Método DPPH	180
	Método FRAP	182
5.5	CONCLUSIONES PARCIALES	184
Capítulo 6 - EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES HIPOGLUCÉMICAS EN HARINAS DE LEGUMINOSAS PROCESADAS		187
6.1	IMPORTANCIA DEL ESTUDIO	188
6.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	189
6.3	MATERIALES Y MÉTODOS	189
	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	189
	PROPIEDADES HIPOGLUCÉMICAS	190
	Determinación de la Capacidad de Adsorción de Glucosa (CAG)	190
	Determinación de la Difusión de Glucosa (DG)	191
	Determinación de la Capacidad de Inhibir la Actividad α -Amilasa (CIA α)	193
	Determinación de la digestibilidad del almidón (DiAl)	194
6.4	RESULTADOS Y DISCUSIONES	194
	CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE GLUCOSA (CAG)	195

Índice de Adsorción de Glucosa (IAG)	198
DIFUSIÓN DE GLUCOSA (DG)	201
Índice de Retardo de Diálisis de Glucosa (IRDG)	207
Glucosa total adsorbida por la fibra en el sistema: glucosa → fibra → membrana	208
Velocidad máxima de difusión de glucosa	209
Flujo de Difusión de Glucosa ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	209
CAPACIDAD DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD α -AMILASA (CIAa)	211
DIGESTIBILIDAD DEL ALMIDÓN (DiAl)	212
Índice de digestibilidad del almidón (IDiAl)	215
Velocidad máxima de digestibilidad del almidón	216
6.5 CONCLUSIONES PARCIALES	217
Capítulo 7 - CARACTERIZACIÓN DE LAS LEGUMINOSAS PROCESADAS:	
PROPIEDADES TECNOLÓGICAS	221
7.1 RELEVANCIA DEL ESTUDIO	222
7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	222
7.3 METODOLOGÍA	223
DENSIDAD APARENTE	223
DETERMINACIÓN DEL pH	224
DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ TOTAL (AcT)	224
DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE ACEITE (CRAc)	224
DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INTERCAMBIO CATIONICO (CIC)	224
DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE GELIFICACIÓN (CG)	225
DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD EMULSIONANTE (CEm)	225
DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ESPUMANTE (CEs) Y LA ESTABILIDAD DE LA ESPUMA (EsE)	226
DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE HIDRATACIÓN	227
Capacidad de absorción de agua (CA)	227
Capacidad de retención de agua (CRA)	227
Capacidad de hinchamiento (CH)	227
7.4 RESULTADOS Y DISCUSIONES	228
DENSIDAD APARENTE (DA)	228
DETERMINACIÓN DEL pH	229
ACIDEZ TOTAL (AcT)	229
CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE ACEITE (CRAc)	230
CAPACIDAD DE INTERCAMBIO CATIONICO (CIC)	232
CAPACIDAD DE GELIFICACIÓN (CG)	233
CAPACIDAD EMULSIONANTE (CEm)	236
CAPACIDAD ESPUMANTE (CEs) Y ESTABILIDAD DE LA ESPUMA (EEs)	238
PROPIEDADES DE HIDRATACIÓN	241
Capacidad de absorción de agua (CAA)	242
Capacidad de retención de agua (CRA)	244
Capacidad de hinchamiento (CH)	246
7.5 CONCLUSIONES PARCIALES	247
CONCLUSIONES GENERALES	249
BIBLIOGRAFÍA	253

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla III.1 - Consumo per cápita de leguminosas en el hogar entre 2008 y 2010 España. _____	17
Tabla III.2 - Composición nutricional (g/100g) de las principales leguminosas de consumo humano. _____	22
Tabla III.3 - Principales componentes estructurales de las paredes celulares vegetales. _____	34
Tabla III.4 (cont.) - Propiedades físico-químicas de la fibra alimentaria. _____	41
Tabla III.5 - Efectos fisiológicos de la fibra alimentaria. _____	43
Tabla III.6 - Requerimiento diario de fibra alimentaria establecido por organismos gubernamentales o según grupos de investigación. _____	46
Tabla III.7 - Efectos positivos y negativos de diferentes componentes bioactivos de las leguminosas. _____	47
Tabla 1.1 – Composición química de leguminosas crudas y procesadas. _____	72
Tabla 2.1 – Composición gravimétrica de la fibra alimentaria: insoluble (FI), soluble (FS) y total (FT); de leguminosas crudas y procesadas (mg/g ms). _____	86
Tabla 2.2 – Composición de carbohidratos de la fibra insoluble de leguminosas crudas y procesadas (mg/g ms). _____	90
Tabla 2.3 – Composición de carbohidratos de la fibra soluble de leguminosas crudas y procesadas (mg/g ms). _____	98
Tabla 2.4 – Composición de carbohidratos de la fibra total en leguminosas crudas y procesadas (mg/g ms). _____	101
Tabla 2.5 – Relación entre el contenido de ácidos urónicos (AU) y azúcares neutros (AN) de las fracciones de la fibra alimentaria. _____	103
Tabla 2.6 – Composición amilácea de leguminosas crudas y procesadas (mg/g ms). _____	104
Tabla 3.1 – Rendimiento del residuo libre de almidón (RLA) en relación a materia seca (g RLA/100 g ms), de leguminosas crudas y procesadas. _____	124
Tabla 3.2 – Composición de carbohidratos del residuo libre de almidón (RLA) de leguminosas crudas y procesadas (mg/g RLA). _____	126
Tabla 3.3 – Relación entre el contenido de ácidos urónicos (AU) y de azúcares neutros (AN = Gal + Ara) del RLA de leguminosas crudas y procesadas. _____	134
Tabla 3.4 – Grado de Metilesterificación (%) del RLA de leguminosas crudas y procesadas. _____	135
Tabla 3.5 – Composición en carbohidratos de la fracción extraída por CDTA de leguminosas crudas y procesadas (mg/g RLA). _____	139
Tabla 3.6 – Composición en carbohidratos de la fracción extraída por Na ₂ CO ₃ de leguminosas crudas y procesadas (mg/g RLA). _____	142
Tabla 3.7 – Composición en carbohidratos de la fracción extraída por KOH 1 M de leguminosas crudas y procesadas (mg/g RLA). _____	146
Tabla 3.8 – Composición en carbohidratos de la fracción extraída por KOH 4 M de de leguminosas crudas y procesadas (mg/g RLA). _____	147
Tabla 3.9 – Composición en carbohidratos del material residual (α -celulosa) del fraccionamiento de leguminosas crudas y procesadas (mg/g RLA). _____	152
Tabla 5.1 – Diluciones de las muestras de leguminosas que presentan absorbancia constante en ensayo de 2 horas de incubación. _____	177
Tabla 5.2 – Contenido de polifenoles totales (mg EAG/g ms) en leguminosas crudas y procesadas. _____	179
Tabla 5.3 – Capacidad antioxidante (EC ₅₀) (μ mol ET/g ms) en leguminosas crudas y procesadas, según el método DPPH. _____	181

Tabla 5.4 – Capacidad antioxidante ($\mu\text{mol ET/g ms}$) en leguminosas crudas y procesadas, según el método FRAP.	182
Tabla 6.1 – Capacidad de absorción de glucosa (mmol/g RLA) de leguminosas crudas y procesadas.	196
Tabla 6.2 – Regresión cuadrática de CAG (mmol/g RLA) frente a concentración de glucosa (mM).	197
Tabla 6.3 – Difusión de la Glucosa (μmol) del RLA de leguminosas crudas y procesadas.	202
Tabla 6.4 – Difusión de la Glucosa ($\mu\text{mol/g RLA}$) de leguminosas crudas y procesadas.	206
Tabla 6.5 – Velocidad máxima de difusión de glucosa ($\mu\text{mol/min}$) de leguminosas crudas y procesadas.	209
Tabla 6.6 – Producción de glucosa ($\text{mmol glucosa/g RLA/h}$) y capacidad de inhibición de la actividad de α -amilasa (CIAa).	211
Tabla 6.7 – Capacidad de digestibilidad del Almidón (μmol) de leguminosas crudas y procesadas.	213
Tabla 6.8 – Velocidad máxima de difusión de glucosa (mmol/min) en la Digestibilidad del Almidón.	216
Tabla 7.1 – Densidad Aparente (DA) (g ms/ml) de harinas de leguminosas crudas y procesadas.	228
Tabla 7.2 – Valores de pH de leguminosas crudas y procesadas.	229
Tabla 7.3 – Valores de acidez total ($\text{g ácido Acético/kg ms}$) en leguminosas crudas y procesadas.	230
Tabla 7.4 – Capacidad de Retención de Aceite (CRAc) (ml/g ms) de leguminosas crudas y procesadas.	231
Tabla 7.5 – Capacidad de intercambio catiónico (CIC) de leguminosas crudas y procesadas (meq/kg RLA).	233
Tabla 7.6 – Mínima concentración de harina a la cual tiene lugar la gelificación (MCG) (%) de leguminosas crudas y procesadas.	234
Tabla 7.7 – Capacidad Emulsionante (CEm) (%) de leguminosas crudas y procesadas.	237
Tabla 7.8 – Capacidad Espumante (CEs) en % de leguminosas crudas y procesadas.	238
Tabla 7.9 – Capacidad de Absorción de Agua (CAA) (ml/g ms) de leguminosas crudas y procesadas.	242
Tabla 7.10 – Capacidad de Retención de Agua (CRA) (ml/g ms) en leguminosas crudas y procesadas.	244
Tabla 7.11 – Capacidad de Hinchamiento (CH) (ml/g ms) en leguminosas crudas y procesadas.	246

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura III.1 - Producción mundial de leguminosas (millones de toneladas) (FAOSTAT, 2011).	15
Figura III.2 - (A) Evolución nacional de la producción de las principales leguminosas grano (mil toneladas). (B) Producción total de leguminosas en España. (C) Detalle de la producción española de frijoles y lentejas (FAOSTAT, 2011).	16
Figura III.3 - Estructura de la semilla de leguminosa - <i>Phaseolus</i> sp.	19
Figura III.4 - (A) Planta de judía (<i>P. vulgaris</i> L.), (B) granos de <i>P. vulgaris</i> sub <i>volubilis</i> variedad Tolosa negra.	20
Figura III.5 - Región de procedencia de judía de Tolosa, País Vasco - España.	20
Figura III.6 - (A) Lenteja (<i>L. culinaris</i>), (B) variedad Rubia de la Armuña, (C) lenteja de La Armuña cocida comercializada.	21
Figura III.7 - Indicación Geográfica Protegida de lenteja de La Armuña, Salamanca - España.	21
Figura III.8 - Clasificación de los carbohidratos.	24
Figura III.9 - (A) Estructura del almidón. (B) Granos de almidón en células de semilla de lenteja.	26
Figura III.10 - (A) Estructura amilosa. (B) Estructura amilopectina.	26
Figura III.11 - (A) Productos de la hidrólisis del Almidón (maltosa, dextrina y glucosa). (B) Estructura de la glucosa.	27
Figura III.12 - (A) Composición de la pared celular vegetal. (B) Capas de la pared vegetal secundaria.	31
Figura III.13 - Estructura de la pared celular.	32
Figura III.14 - (A) Pared Celular Primaria, microfibrillas de celulosa (disposición desordenada, entrelazadas). (B) Pared Celular Secundaria, microfibrillas de celulosa (disposición ordenada).	33
Figura III.15 - Matriz de la pared celular (Raven y col., 1991).	34
Figura III.16 - Clasificación y composición de la fibra en función de su solubilidad en agua (Escudero y González, 2006).	35
Figura III.17 - Composición de la fibra alimentaria (AACC, 2001).	36
Figura III.18 - Estructura de la celulosa.	37
Figura III.19 - Efectos fisiológicos de la fibra (Zarzuelo y Gálvez, 2005).	42
Figura III.20 - Alimentos enriquecidos en fibra (pan, cereales, leche, tallarines, sumos).	45
Figura III.21 - Germinación de <i>Phaseolus</i> sp.	57
Figura 1.1 - Determinación del volumen por desplazamiento de agua.	67
Figura 1.2 - (A) Horno mufla con crisoles. (B) Crisoles con muestra de cenizas.	68
Figura 1.3 - Sistema Kjeldahl: (A) Bloque digestor; (B) placa calefactora; (C) controlador de temperatura y tiempo.	69
Figura 1.4 - Características morfológicas y físicas de semillas de leguminosas crudas.	71
Figura 1.5 - Contenido de cenizas de leguminosas crudas y procesadas (g/100 g ms).	73
Figura 1.6 - Contenido de grasa de leguminosas crudas y procesadas (g/100 g ms).	74
Figura 1.7 - Contenido de proteína bruta de leguminosas crudas y procesadas (g/100 g ms).	75
Figura 1.8 - Composición química de leguminosas crudas y procesadas (g/100 g ms).	77
Figura 2.1 - (A) Tratamiento enzimático de harina de leguminosas y (B) sistema Fibertec de separación de fibra insoluble y fibra soluble.	82
Figura 2.2 - Porcentaje de fibra insoluble (FI) y fibra soluble (FS) en muestras de leguminosas crudas y procesadas (%).	87

Figura 2.3 - Composición en azúcares neutros, AU y lignina de la fibra insoluble de leguminosas crudas y cocidas (%).	92
Figura 2.4 - Composición de azúcares neutros, AU y lignina de la fibra insoluble de leguminosas crudas y germinadas (%).	93
Figura 2.5 - Porcentaje de glucosa extraída en hidrólisis suave (HS: H ₂ SO ₄ 0,6 M) con respecto al contenido extraído en hidrólisis fuerte (HF: H ₂ SO ₄ 12 M).	94
Figura 2.6 - Porcentaje de arabinosa y ácidos urónicos (AU) extraídos en hidrólisis suave (HS: H ₂ SO ₄ 0,6 M) respecto a la hidrólisis fuerte (HF: H ₂ SO ₄ 12 M).	95
Figura 2.7 - Dendrograma de la composición de carbohidratos de la fibra insoluble de leguminosas crudas y procesadas.	96
Figura 2.8 - Dendrograma de la composición de carbohidratos de la fibra soluble de leguminosas crudas y procesadas.	99
Figura 2.9 - Composición de carbohidratos totales de las fracciones de la fibra alimentaria (mg/g ms).	102
Figura 2.10 - Porcentaje de los componentes de la fracción amilácea (almidón disponible y almidón resistente) de leguminosas crudas y procesadas (%).	106
Figura 2.11 - Dendrograma de la composición de carbohidratos de la fracción amilácea de leguminosas crudas y procesadas.	107
Figura 3.1 - Esquema del método de obtención del Residuo Libre de Almidón (RLA).	116
Figura 3.2 - Esquema del fraccionamiento secuencial no degradativo de la pared celular de leguminosas crudas y procesadas.	120
Figura 3.3 - Esquema del proceso de diálisis de los sobrenadantes de las etapas de fraccionamiento secuencial no degradativo de la pared celular.	121
Figura 3.4 - Diálisis utilizando membranas de 12.000-14.000 kD.	122
Figura 3.5 - Principales características del método de fraccionamiento secuencial no degradativo de la pared celular.	123
Figura 3.6 - Composición de azúcares neutros, AU y lignina del RLA de leguminosas crudas y cocidas.	129
Figura 3.7 - Composición en azúcares neutros, AU y lignina del RLA de leguminosas crudas y germinadas.	133
Figura 3.8 - Correlación entre AU/AN y el grado de metilesterificación (GM %) del RLA de muestras crudas y cocidas de leguminosas.	136
Figura 3.9 - Composición de la pared celular según las etapas del fraccionamiento secuencial no degradativo (%) de leguminosas crudas y procesadas.	137
Figura 3.10 - Porcentaje de azúcares neutros y ácidos urónicos que componen la fracción de CDTA de leguminosas crudas y procesadas.	140
Figura 3.11 - Porcentaje de azúcares neutros y ácidos urónicos que componen la fracción de Na ₂ CO ₃ de leguminosas crudas y procesadas.	143
Figura 3.12 - Porcentaje de azúcares neutros, ácidos urónicos y lignina que componen la fracción de KOH 1 M de leguminosas crudas y procesadas.	149
Figura 3.13 - Porcentaje de azúcares neutros, ácidos urónicos y lignina que componen la fracción de KOH 4 M de leguminosas crudas y procesadas.	149
Figura 3.14 - Porcentaje de azúcares que componen la fracción residual de leguminosas crudas y procesadas.	153
Figura 4.1 - Esquema de la electroforesis bidimensional. Las proteínas se separan mediante dos procesos secuenciales. La primera separación se basa en la carga eléctrica de la proteína y la segunda en el tamaño molecular.	160
Figura 4.2 - Nanodrop utilizado para cuantificación de proteínas.	162

Figura 4.3 - Mini-Protean III (Bio-Rad) utilizado para polimerización de los geles en la electroforesis.	163
Figura 4.4 - Sistema Protean IEF (Bio-Rad) utilizado para el isoelectroenfoque.	164
Figura 4.5 - Geles SDS-PAGE en agitación con Azul de Coomassie.	165
Figura 4.6 - Concentración de proteínas (mg proteína / ml extracto RLA) en leguminosas crudas y procesadas.	166
Figura 4.7 - Perfiles proteicos, separados por masa molecular, de extractos de leguminosas crudas y procesadas.	167
Figura 4.8 - Electroforesis bidimensional de extracto de leguminosas crudas y procesadas en un intervalo de pl de 3 a 7 para muestras de judía, y 3 a 8 para muestras de lenteja.	169
Figura 5.1 - Comparación entre los resultados del método DPPH y FRAP ($\mu\text{mol ET/g ms}$) en leguminosas crudas y procesadas.	183
Figura 6.1 - Esquema del método de cuantificación de glucosa utilizando el kit enzimático K-GLUC (Megazyme).	190
Figura 6.2 - Sistema de Difusión de Glucosa en el control y en la muestra o celulosa.	192
Figura 6.3 - Esquema de difusión simples en membrana.	193
Figura 6.4 - (A) Capacidad de absorción de glucosa ($\text{mmol glucosa/g RLA}$). (B) Índice de adsorción de glucosa (%).	199
Figura 6.5 - β -D-Glucosa en proyección <i>Haworth</i> y en sus conformaciones silla: $^4\text{C}_1$ y $^1\text{C}_4$.	200
Figura 6.6 - Dendrograma de la Capacidad de Adsorción de Glucosa de leguminosas crudas y procesadas.	201
Figura 6.7 - Glucosa en el dializado o Difusión de Glucosa (μmol) de leguminosas crudas y procesadas.	204
Figura 6.8 - Dendrograma de la Difusión de Glucosa de leguminosas crudas y procesadas.	205
Figura 6.9 - Índice de Retardo de Diálisis de Glucosa (%) de RLA de leguminosas crudas y procesadas.	207
Figura 6.10 - Total de glucosa adsorbida por el RLA de leguminosas crudas y procesadas a los 180 minutos de incubación, según el método de Difusión de Glucosa.	208
Figura 6.11 - Flujo de glucosa ($\mu\text{mol/min}$) por bolsa de diálisis del RLA de leguminosas crudas y procesadas.	210
Figura 6.12 - Dendrograma de la Digestibilidad del Almidón de leguminosas crudas y procesadas.	214
Figura 6.13 - (A) Influencia del RLA de leguminosas en la digestibilidad del almidón (μmol); (B) Índice de digestibilidad del almidón IDiAl (%).	215
Figura 6.14 - Flujo de glucosa (mmol/min) en la Digestibilidad del Almidón de leguminosas crudas y procesadas.	217
Figura 7.1 - Determinación de la densidad aparente.	223
Figura 7.2 - (A) Politron, (B) muestra siendo agitada durante 5 minutos, (C) volumen de espuma medido a intervalos de tiempo y (D) Vt volumen total después de la agitación y VL volumen del líquido (se excluye el volumen de espuma).	226
Figura 7.3 - Relación inversa entre la capacidad de gelificación (CG) y la mínima concentración de material para gelificarse (MCG). Cuanto menor la MCG mayor es la CG.	234
Figura 7.4 - Relación entre la mínima concentración de gelificación (MCG) y el pH de las muestras de leguminosas crudas y procesadas.	236
Figura 7.5 - Estabilidad de la espuma (EEs) en leguminosas crudas y procesadas (%).	240
Figura 7.6 - Pérdidas en la estabilidad espumante (EEs), de leguminosas crudas y procesadas.	241

I INTRODUCCIÓN

I



I INTRODUCCIÓN

A pesar de los reconocidos beneficios de la dieta Mediterránea –que en el año 2010 obtuvo el reconocimiento de la UNESCO–, en las últimas décadas los países de la cuenca Mediterránea han cambiado sustancialmente sus hábitos, lo cual permite explicar que la enfermedad cardiovascular represente la primera causa de mortalidad en nuestro medio. Asimismo, una dieta incorrecta es la génesis de otras enfermedades crónicas que atenazan nuestra sociedad, como son la obesidad y la *diabetes mellitus*, configurando en su conjunto el temido síndrome metabólico. Son numerosas las autoridades sanitarias que alertan sobre la necesidad de prevenir las enfermedades cardiovasculares –la gran epidemia del siglo XXI– a través de la alimentación.

Los alimentos y los componentes alimentarios pueden ejercer una influencia beneficiosa sobre las funciones fisiológicas, al mejorar el estado de bienestar y salud, y reducir o prevenir el riesgo de enfermedad. En este contexto se encuadran los denominados “alimentos funcionales”, cuya demanda por parte de los consumidores va en aumento, lo que les convierte en productos con un importante crecimiento en el mercado. Los alimentos funcionales no constituyen una entidad única, bien definida y correctamente caracterizada; de hecho, una amplia variedad de productos alimenticios se incluyen (o se incluirán en el futuro) en esta categoría de alimentos.

Asimismo, el perfil del consumidor ha cambiado drásticamente en la sociedad actual; han surgido nuevas preferencias y necesidades del mercado. Son muchos los motivos para apostar por nuevos productos: las exigencias de los diversos sectores de población (población infantil, personas mayores, nuevas comunidades, globalización, influencia del turismo...) y de la industria alimentaria; el interés por los aspectos nutricionales y de salud, como es el caso de los alimentos dirigidos a determinados sectores de la población con requerimientos específicos, la reducción y/o eliminación de ciertos nutrientes así como la incorporación de otros (fibra alimentaria, vitaminas, minerales, antioxidantes, ácidos grasos poliinsaturados, etc.) que pueden reportar al consumidor un beneficio para la salud y una mayor calidad de vida. La cada vez más diversificada industria alimentaria necesita productos específicos para cada sector, desarrollando nuevos alimentos que sean capaces de cubrir las exigencias nutricionales de aquellas personas que no pueden nutrirse adecuadamente con una alimentación normal y que requieren una suplementación o una dieta específica. En este sentido, determinados grupos de población podrán optar a una amplia gama de productos destinados a una mejora de la salud.

Los beneficios para la salud asociados con la dieta mediterránea se deben a la ingesta significativa de alimentos vegetales y bebidas funcionales, es decir, frutas, verduras, cereales, legumbres, nueces, vino, cerveza y aceite de oliva, que contienen una gran gama de fitoquímicos bioactivos o compuestos nutraceuticos. En este sentido, se ha observado en algunos grupos de población el bajo riesgo de padecer enfermedades crónicas, como enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer, como resultado de un estilo de alimentación diversificada, ya sea en alimentos como en sus componentes. Entre los alimentos vegetales de especial interés destacan las **leguminosas**. Existen numerosos estudios acerca de sus componentes más importantes, principalmente proteínas y carbohidratos, así como fibra alimentaria y antinutrientes, sin embargo se ha observado que las leguminosas tienen una matriz diferente cada una de ellas por lo que resulta muy necesario la caracterización (especialmente de la pared celular) de cada una de las distintas legumbres, en concreto aquellas con denominación de origen (D.O.) para su posible utilización como ingredientes de funcionalidad mejorada en la dieta de los consumidores.

El consumo de leguminosas lleva asociado la aplicación de tratamientos tecnológicos (especialmente térmicos) que aumentan la digestibilidad y mejoran las cualidades sensoriales como la textura, el sabor y el aroma, además de los atributos nutricionales. La cocción es habitualmente el proceso más común al que se someten las leguminosas, pero no hay que olvidar que un exceso de cocción lleva consigo una reducción de la calidad nutritiva del alimento, debido a pérdidas de parte de sus nutrientes, además del consiguiente gasto económico. Junto con estas prácticas culinarias tradicionales en la cultura occidental, hay otras menos conocidas en nuestra sociedad, como la germinación, aunque es una técnica ancestral en el Lejano Oriente. La aplicación de este proceso biológico, de amplio uso tradicional, tiene actualmente un gran interés nutricional e industrial, ya que se consiguen nuevos productos con elevado valor nutritivo que podrían ser usados para determinados grupos de la población como ancianos, niños,..., o utilizarse para suplementar otros alimentos pobres en proteínas.

Durante la germinación, las enzimas que se sintetizan comienzan la hidrólisis del almidón y de las proteínas, por lo que dan lugar a alimentos más fáciles de digerir. Como consecuencia de la acción de estas enzimas tiene lugar la síntesis de nuevos constituyentes de la célula, por lo que se producen numerosos cambios bioquímicos, nutricionales y sensoriales. El proceso de germinación generalmente mejora la calidad nutricional de las legumbres, no sólo por la reducción de los componentes antinutritivos, sino también por el aumento de los niveles de aminoácidos libres, carbohidratos aprovechables, fibra alimentaria y otros componentes, y aumenta la funcionalidad de las semillas debido al incremento del contenido de determinados compuestos bioactivos

entre los que se destacan los compuestos fenólicos. Por otra parte, dicho proceso ejerce una gran influencia en el contenido en vitaminas, ya que estimula la biosíntesis de determinadas vitaminas hidrosolubles. Las investigaciones relacionadas con los cambios que induce la germinación sobre la composición en carbohidratos prebióticos (fibra alimentaria, almidón resistente) han evidenciado modificaciones en la estructura de los polisacáridos, afectando a la integridad de los tejidos y provocando la ruptura de las asociaciones proteínas-carbohidratos. Los cambios metabólicos observados están afectados por las condiciones de germinación, como luz y días de proceso. Las modificaciones en la concentración de estos compuestos se traducen en la modificación de sus propiedades tecno-funcionales y posibles efectos biológicos de las leguminosas germinadas. El consumo de alimentos germinados, tales como los brotes de soja, está adquiriendo un gran auge en la población occidental, ya que se ha demostrado científicamente las excelentes cualidades nutritivas y organolépticas. Últimamente, se están introduciendo con relativo éxito las harinas germinadas de lentejas y judías en el mercado europeo. Por otra parte, en la actualidad, la industria alimentaria está mostrando un creciente interés en las leguminosas, además de por su valor nutritivo, por las excelentes propiedades que presentan sus harinas, lo que constituye la base funcional de diversos productos principalmente los de bajo contenido proteico. El conocimiento de las propiedades tecnofuncionales de estas harinas resulta primordial en relación con sus posibilidades de utilización.

Por todo ello, suscita gran interés el estudio de las modificaciones que durante el proceso de germinación pueden sufrir las paredes celulares vegetales, origen de la fibra alimentaria, el almidón resistente y los compuestos fenolicos en leguminosas de consumo habitual, como lenteja y judía. Los resultados que se obtengan de la investigación servirán para informar al consumidor de los efectos beneficiosos de incluir estas leguminosas procesadas en su dieta habitual.

II OBJETIVOS

II



II OBJETIVOS

Uno de los pilares de la dieta mediterránea son las legumbres, un alimento de renovado interés nutricional, puesto que contiene compuestos bioactivos que pueden presentar efectos beneficiosos para nuestra salud. Además de la presencia de compuestos fenólicos relacionados con la actividad antioxidante resultan de gran interés otros componentes con una funcionalidad prebiótica (fibra alimentaria, y almidón resistente) por los numerosos efectos positivos sobre el organismo.

Sin embargo, la presencia de las leguminosas en la dieta queda cada día más relegada, por lo que se hace necesario encontrar nuevas formas de incorporarlas a la vida moderna. Actualmente, el proceso de germinación ha puesto en evidencia una mejora en la calidad nutricional y sensorial de las leguminosas. Este proceso puede significar una vía que atraiga la atención del consumidor con la consiguiente incorporación de germinados en su dieta.

Por este motivo el objetivo general del presente proyecto de Tesis Doctoral es avanzar en el conocimiento científico de compuestos de la pared celular vegetal, concretamente fibra alimentaria, y del almidón resistente, así como de los efectos de la aplicación de los procesos de cocción y germinación. Se ha empleado como modelo vegetal semillas de leguminosas (judía variedad Tolosa y lenteja variedad La Armuña), para la posible utilización de sus harinas como ingredientes de funcionalidad mejorada en una dieta de un colectivo de personas sanas. Asimismo, surge la necesidad de evaluar las modificaciones que los procesos anteriormente mencionados originan sobre las propiedades físico-químicas y tecnofuncionales de las harinas obtenidas, que pueden resultar de gran interés para la industria alimentaria y de restauración. Los resultados derivados de la investigación servirán para informar al consumidor sobre los efectos beneficiosos de la inclusión de estas leguminosas procesadas en su dieta habitual.

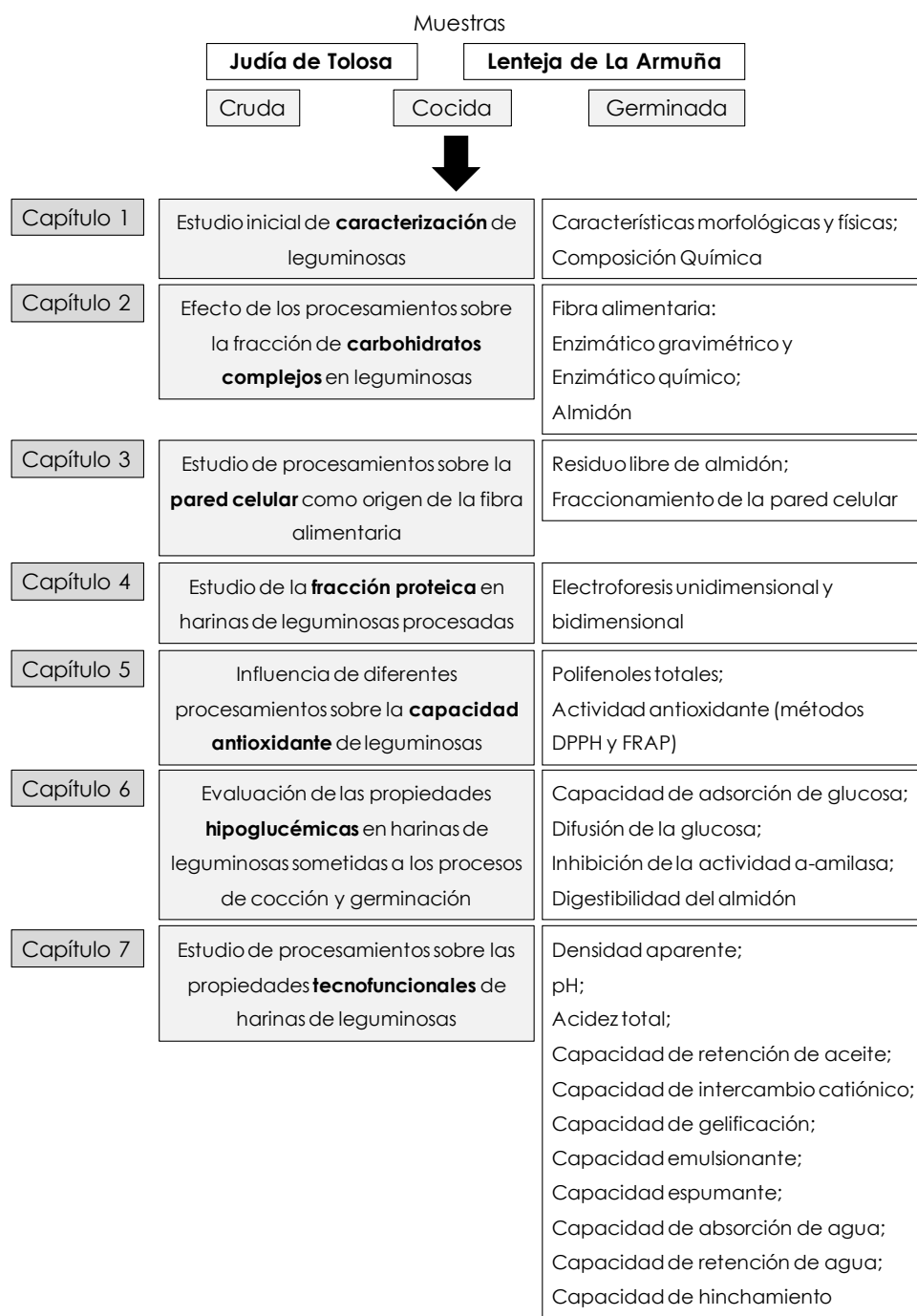
El objetivo global de este trabajo se ha desarrollado a través de los siguientes objetivos específicos:

1. Estudio inicial de caracterización de leguminosas (Capítulo 1);
2. Evaluación de la influencia de los procesos de cocción y germinación sobre los principales componentes de leguminosas:
 - o Fracción de carbohidratos complejos (fibra alimentaria y almidón) (Capítulo 2);
 - o Pared celular como origen de la fibra alimentaria (Capítulo 3);
 - o Fracción proteica (Capítulo 4); y

- o Polifenoles totales y capacidad antioxidante (Capítulo 5);
- 3. Evaluación de las propiedades hipoglucémicas en harinas de leguminosas sometidas a los procesos de cocción y germinación (Capítulo 6).
- 4. Estudio de la repercusión de dichos procesos sobre las propiedades tecnofuncionales de harinas de leguminosas (Capítulo 7).

Este estudio forma parte del proyecto de investigación "Valoración de componentes bioactivos (compuestos fenólicos y componentes de la pared celular), como criterio de calidad de leguminosas crudas y procesadas", proyecto nº **AGL2008-05673-C02-02/ALI** enmarcado en las Acciones Estratégicas del Programa Nacional de Alimentación del del Ministerio de Ciencia e Innovación, en colaboración con el Instituto de Fermentaciones Industriales. Este trabajo se ha llevado a cabo fundamentalmente en el Laboratorio de Caracterización de Productos Vegetales del Departamento de Producción y Caracterización de Nuevos Alimentos del CIAL (Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación) y del Departamento de Química Agrícola de la Universidad Autónoma de Madrid. El análisis de las proteínas fue realizado en Instituto de Medicina Molecular Aplicada (IMMA) de la Universidad San Pablo CEU.

Para lograr estos objetivos se ha llevado a cabo el siguiente **Plan de Trabajo:**



*"La lectura es como el alimento;
el provecho no está en proporción de lo que se come,
sino de los que se digiere."*

Jaime Luciano Balmes

III ANTECEDENTES

III



Júlia Pereira Neves

III - ANTECEDENTES

III.1 IMPORTANCIA DE LAS LEGUMINOSAS EN LA ALIMENTACIÓN

Las leguminosas tienen importancia desde el punto de vista agrícola debido a la superficie mundial que se dedica a su cultivo y por su capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico por la simbiosis con la bacteria *Rhizobium* del suelo, lo que permite elevar la fertilidad del sustrato, reemplazando parcialmente el uso de fertilizantes nitrogenados caros. Las legumbres, que pueden ser utilizadas en la alimentación humana y animal, revisten una especial importancia nutritiva y económica debido a su presencia en la nutrición de millones de personas de todo el mundo (FAO, 2003).

Desde la más remota antigüedad, las leguminosas han sido utilizadas por la humanidad, tornándose alimentos esenciales y de consumo diario o semanal en la mayor parte del mundo. Estos alimentos presentan beneficios significativos para la nutrición humana y para la salud cuando se consumen con regularidad en dietas bien equilibradas, provocando una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares, cáncer y diabetes entre otras (Mazu y col., 1998; Zulet y Martínez, 2001).

La utilización de las legumbres como alimentos se concentra en los países en desarrollo, que representan el 90% del consumo mundial de legumbres destinadas a alimentación humana. Las legumbres presentan una importancia especial para los países de bajos ingresos y con déficit de alimentos, cuyas principales fuentes de proteínas y energía son los productos de origen no animal contribuyendo al 10% de las proteínas diarias recomendadas y a un 5% del aporte energético de la población. Alrededor del 75% de las legumbres en estos países se destina al consumo humano, mientras que el uso como pienso representa menos del 15% (FAO, 2010).

Datos de la Producción y Consumo de Leguminosas

La producción mundial de legumbres se estima en cerca de 67 millones de toneladas en 2010 (Figura III.1), siendo los países industrializados los que aportan la mayor producción.

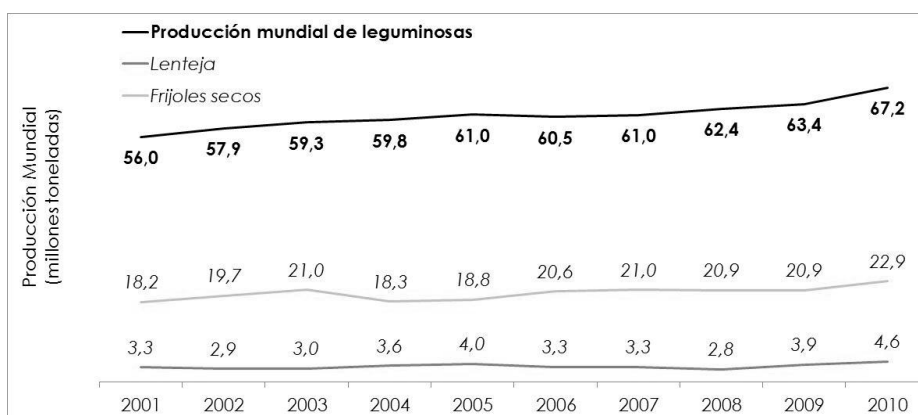
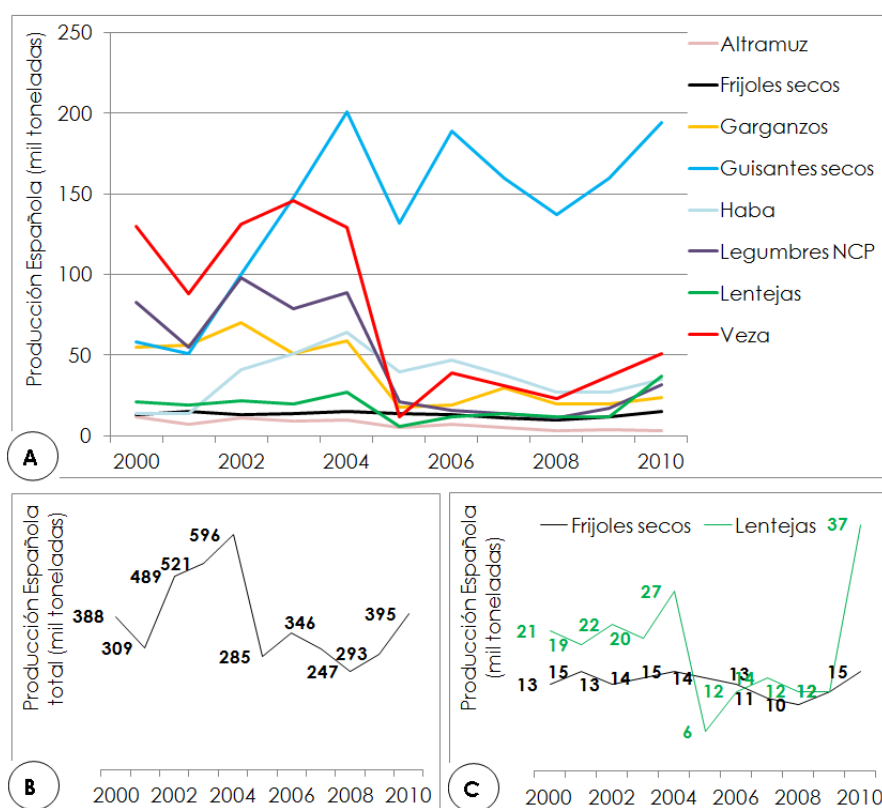


Figura III.1 - Producción mundial de leguminosas (millones de toneladas) (FAOSTAT, 2011).

En los países industrializados se observa un incremento en el consumo *per cápita* de legumbres, lo que se atribuye a la conciencia sobre los beneficios para la salud. En este sentido las legumbres constituyen una excelente alternativa y ofrecen la ventaja adicional de un buen aporte de fibra. Otro factor que puede haber contribuido al incremento de su consumo es la inmigración, que ha aumentado de forma espectacular en el periodo de estudio (FAO, 2005). El consumo de legumbres es menor en Europa que en otras regiones del mundo y muestra una amplia variabilidad, debido a las diferencias interregionales en los hábitos alimentarios y las tradiciones, así como a diferencias en el aprovisionamiento. España, Francia y Reino Unido consumen un 60% del total de legumbres en Europa (Shneider, 2002).

La producción de leguminosas en España, a partir de 2005, oscilaba alrededor de las 350.000 toneladas al año. La tendencia a partir de 2008 es creciente (Figura III.2B). Las principales leguminosas producidas en el país, en 2010, fueron por orden decreciente de producción: guisantes secos, veza, lentejas, habas, garbanzos, frijoles secos y altramu¿, (Figura III.2A). En ese año la producción de lenteja alcanzó las 37.000 toneladas y la de frijoles secos llegó a las 15.000 toneladas (Figura III.2C), mostrando un crecimiento importante a partir de 2008.



NCP: no clasificado previamente

Figura III.2 - (A) Evolución nacional de la producción de las principales leguminosas grano (mil toneladas). (B) Producción total de leguminosas en España. (C) Detalle de la producción española de frijoles y lentejas (FAOSTAT, 2011).

En España, según el Panel de Consumo Alimentario del actual Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente ha habido un descenso continuado en el consumo de legumbres a partir de la década de los 70, lo que se atribuye a la pérdida de la dieta mediterránea (Varela-Moreira y col., 2008), el desarrollo del sector ganadero, el escaso interés del sector industrial en cuanto a la comercialización de semillas de leguminosas, a los menores incentivos agrícolas para cultivos rentables y a la tendencia de los consumidores a elegir proteínas de origen animal, a pesar de la obtención y el registro de nuevas variedades de leguminosas mejoradas agrónomicamente y de elevada calidad. Sin embargo, a pesar de ser un país con gran superficie agrícola, importa hasta el 70% de la legumbre que se comercializa, la cual procede de diversos países (Canadá, Estados Unidos, México, Argentina, Turquía...), debido principalmente a los precios tan competitivos que ofrecen. Por esta razón y para mantener las producciones autóctonas de calidad están cobrando importancia las Indicaciones Geográficas Protegidas, como

Faba de Asturias, Judía del Barco de Ávila, y Lenteja de La Armuña, entre otras, provocando que el consumo no descienda y que se incremente año tras año.

Sin embargo, en la última década el consumo en España se ha estabilizado, estableciéndose a partir de 2005 en 200.000 toneladas al año, destacando los garbanzos como la principal legumbre de consumo (72 millones de kg). Dichas cifras probablemente sean la consecuencia del gran énfasis de científicos y empresas alimentarias en el desarrollo de nuevos productos para introducir más fácilmente las legumbres en la vida moderna. En los años 90 el consumo medio era de 20 g/día, y 20 años después ha llegado a ser la mitad. Sin embargo, aunque el consumo global disminuyó, al evaluarlo por sectores se observa un cambio positivo en restaurantes e instituciones, en los cuales aumentó durante dicho periodo (Aguilera, 2009).

Entre 2008 y 2010 el consumo total de leguminosas en España correspondía a 179 millones de kg, distribuidos entre los hogares (82,5%), la restauración comercial (10,5%) y la restauración social y colectiva (7%). El consumo per cápita, en el hogar, de los distintos tipos de legumbres se muestra en la Tabla III.1.

Tabla III.1 - Consumo per cápita de leguminosas en el hogar entre 2008 y 2010 España.

	Total (kg/hab)	Secas (kg/hab)	Cocidas (kg/hab)
Legumbre	3,29	1,94	1,35
Garbanzos	1,25		
Alubias	1,01		
Lentejas	1,01	0,83	0,18
Otras leguminosas	0,02		

Fuente: Olmedilla-Alonso y col., 2010.

La industria alimentaria está continuamente ensayando tecnologías e ingredientes para producir nuevos alimentos o mejorar algunas propiedades organolépticas, funcionales y nutritivas ya existentes. Las leguminosas han sido empleadas, en función de su composición, de forma directa como ingredientes de las dietas o de piensos compuestos para animales y, alternativamente, en la obtención de aceites vegetales, en la preparación de concentrados de proteína y en la formulación de comidas vegetarianas o de regímenes especiales.

Funcionalidad y recomendaciones dietéticas de las leguminosas

El Departamento de Agricultura de Estados Unidos recomienda aumentar las ingestas de vegetales, y en concreto de legumbres secas y guisantes, para así incrementar el consumo de nutrientes y compuestos fitoquímicos con efectos beneficiosos para la salud (Leterme, 2002; Dietary Guidelines for Americans, 2005). Los resultados de la encuesta NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey, 2005) respaldan esta

recomendación, donde comprueban que sólo el 7,9% de los adultos ingiere dichos alimentos, y observan que bastan alrededor de 90 g de alubias o guisantes secos para proporcionar mayores ingestas de fibra, proteína, fólico, cinc, hierro y magnesio con un menor aporte de grasa (saturada y total).

La Organización Mundial de la Salud recomienda el consumo de legumbres para disminuir el riesgo de enfermedades asociadas con la alimentación, como son, entre otras, la obesidad y la *diabetes mellitus* tipo 2. Debido a que las diferentes legumbres difieren en su composición, en las pautas dietéticas para la población norteamericana (Dietary Guidelines for Americans, 2005) se incluyó la recomendación del consumo de judías como una parte importante de la dieta saludable, en concreto, el consumo de al menos tres tazas de judías cocidas a la semana (1 taza = 225 g).

III.1.1 DESCRIPCIÓN DE LAS LEGUMINOSAS

Leguminosa es una palabra que proviene del latín *legumen* que indica fruto alargado o en espiral (fruto en "legumbre" o "vaina") que contiene varias semillas dispuestas en fila. Las leguminosas, desde el punto de vista botánico, pertenecen a la familia Fabaceae, cuyas especies presentan la característica común de producir vainas. Las Fabaceas se dividen en tres subfamilias, siendo la Papilionoideae la más amplia y prácticamente la única cuyas especies se cultivan para el consumo humano (Amóros, 2000).

De las más de 18.000 especies conocidas, y de todas las que son cultivadas, sólo se producen 20 tipos distintos y que se utilizan como alimento para el ser humano en los diferentes continentes, destacando las semillas de soja (*Glycine max* L.), cacahuete (*Arachis hypogaea* L.), judías (entre las que se encuentran diversas especies del género *Phaseolus*), guisantes (*Pisum sativum* L.), garbanzos (*Cicer arietinum* L.) y lentejas (*Lens culinaris* Medik.).

Las semillas de las leguminosas se diferencian por el color, forma, tamaño y grosor del tegumento (testa), pero la mayoría de éstas tienen una estructura similar, y cuando madura tienen tres partes estructurales principales: cubierta, cotiledón y embrión (Figura III.3).

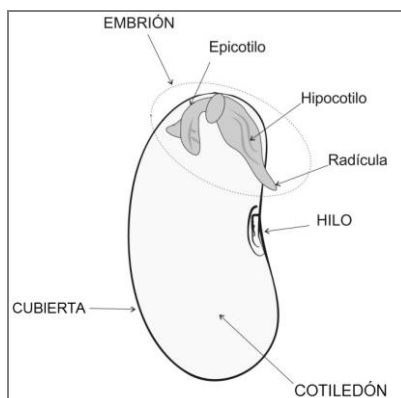


Figura III.3 – Estructura de la semilla de leguminosa - *Phaseolus* sp.

La composición de estas estructuras en semillas de soja es de 8% de tegumento o cubierta, 90% de cotiledones y 2% de embrión, mientras que para los garbanzos la relación es de 15% de tegumento, 84% de cotiledones y 1% de embrión (Amorós, 2000). Entre las leguminosas grano que más aceptación tienen para el consumo humano se encuentran las judías y lentejas, y en España se ha de incluir también los garbanzos, frecuentes todas ellas en la dieta mediterránea.

JUDÍA DE TOLOSA

Taxonómicamente, la judía corresponde a la especie del género *Phaseolus*. Su nombre completo es *Phaseolus vulgaris* L., asignada por Linneo en 1753, a la tribu Phaseoleae, subfamilia Papilionoideae, familia Leguminosae (Fabaceae) y al orden Rosales.

Es una planta anual, de vegetación rápida, con un sistema radicular poco profundo, raíz principal y raíces secundarias muy ramificadas. El tallo herbáceo presenta, en variedades enanas, un porte erguido de 30-40 cm, aunque existen algunas variedades que pueden superar esta altura. Las hojas son compuestas o trifolioladas (Figura III.4A). El grano es ligeramente elíptico, casi redondo, de tamaño mediano, con unos 225 granos por 100 gramos. Su maduración es tardía con un ciclo vegetativo de unos 127 días.

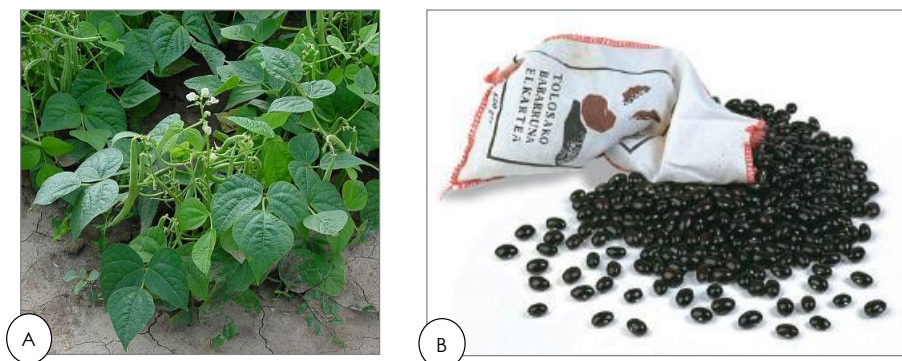


Figura III.4 - (A) Planta de judía (*P. vulgaris* L.), (B) granos de *P. vulgaris* sub *volubilis* variedad Tolosa negra.

La judía común o alubia, *Phaseolus vulgaris* L, es la leguminosa de consumo humano con más importancia mundial en el cultivo. En España, su cultivo ha tenido una gran trascendencia, extendido por la mayor parte de las zonas agrarias del país y, en general, se han cultivado variedades específicas adaptadas a la gastronomía local, de gran calidad, que han generado diferentes figuras de calidad, algunas de ellas con reconocimiento internacional. La judía de Tolosa (*P. vulgaris* subespecie *volubilis* variedad Tolosa negra) (Figura III.4B) es procedente de Tolosa (Guipúzcoa) en el País Vasco (Figura III.5).



Figura III.5 - Región de procedencia de judía de Tolosa, País Vasco - España.

LENTEJA DE LA ARMUÑA

La lenteja (*Lens culinaris* Medikus), de la variedad La Armuña pertenece al tipo "Rubia de la Armuña". Se trata de una planta delgada con tallo de 15-50 cm, pubescente. Hojas con un raquis de 40 a 50 mm de longitud que soportan de 10 a 16 foliolos, las hojas

superiores presentan zarcillos. Pedúnculos florales con 1 a 3 flores, raramente 4, de tamaño muy pequeño, de color blanco o azul. Frutos romboides de 6-20 mm de longitud que contiene 1 ó 2 y raramente 3 semillas. Cotiledones de la semilla son generalmente amarillos (Figura III.6A y B).



Figura III.6 – (A) Lenteja (*L. culinaris*), (B) variedad Rubia de la Armuña, (C) lenteja de La Armuña cocida comercializada.

En el año 1993 el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) aprobó el Reglamento de la Denominación Específica lenteja de la Armuña y de su Consejo Regulador, por lo que es una leguminosa de indicación geográfica protegida (Reglamento CE N° 390/2008). La zona de elaboración y envasado coincide con la zona de producción (Figura III.6C). La zona de producción agrícola tiene una superficie de 756 kilómetros cuadrados (38 municipios) y se localiza en la comarca de La Armuña, al Norte de la provincia de Salamanca (Figura III.7).

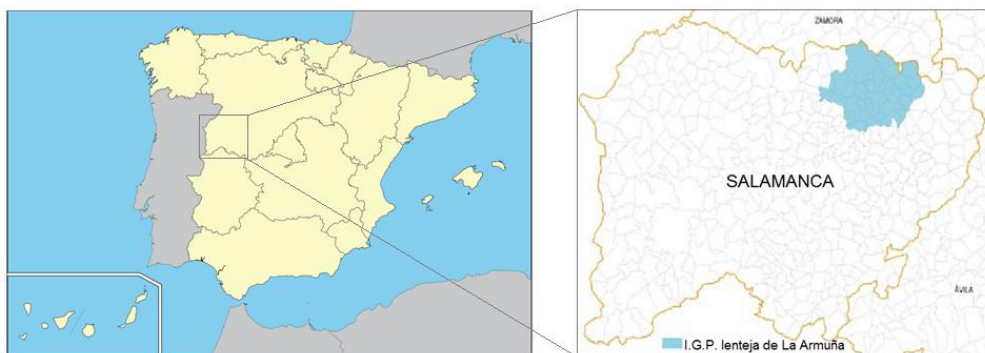


Figura III.7 - Indicación Geográfica Protegida de lenteja de La Armuña, Salamanca - España.

III.2 COMPONENTES PRINCIPALES Y CARACTERÍSTICAS DE LAS LEGUMINOSAS

La composición nutricional media de las leguminosas grano destaca por la fracción de almidón y proteína como las más abundantes respecto al total de los componentes. El valor nutritivo de las leguminosas se debe primeramente a su contenido proteico, a la vez que son fuente importante de carbohidratos complejos, algunos de absorción lenta

como el almidón y otros no digeribles como los componentes de la fibra alimentaria, cuyos efectos beneficiosos son debidos principalmente a sus propiedades físico-químicas. Por otro lado, presentan un bajo contenido en lípidos, excepto en el caso de semillas oleaginosas, estando mayoritariamente constituidos por ácidos grasos poliinsaturados (Zulet y Martínez, 2001). Presentan también algunos componentes bioactivos minoritarios, y son una importante fuente de minerales (calcio, hierro, cinc) y vitaminas (Rege, 1981). Son las fracciones mayoritarias las que tendrán un mayor peso en las propiedades tecnofuncionales de las harinas de leguminosas (Tabla III.2).

Tabla III.2 - Composición nutricional (g/100g) de las principales leguminosas de consumo humano.

Leguminosa	Humedad	Lípidos	Proteínas	Carbohidratos	Fibra	Energía
Judías	8-12	1-2	17-23	45-59	25-27	286
Lentejas	7-9	1-3	20-28	50-58	9-13	314
Garbanzos	6-10	4-6	17-21	50-60	13-17	329
Guisantes	7-9	1-3	20-26	46-50	14-18	317
Habas	6-9	1-2	23-34	55-60	17-21	331
Soja	8-10	17-20	38-42	26-29	9-13	398

Fuente: Zulet y Martínez, 2001.

La composición química de las semillas está determinada genéticamente pero las cantidades relativas pueden variar en función de factores ambientales como la presencia de nutrientes minerales en el suelo o el clima. Sin embargo, la composición de las leguminosas varía considerablemente entre las distintas especies, e incluso entre variedades dentro de una misma especie (McCance y Winddson, 1992).

III.2.1 PROTEINAS

El elevado contenido proteico en la mayoría de especies de leguminosas convierte a esta familia en la principal fuente de proteína vegetal para el hombre (Cubero y Moreno, 1983). El porcentaje medio de contenido en las legumbres se sitúa entre el 20-25%, encontrándose valores de hasta un 40% en el caso del altramuza. La mayoría de estas proteínas (80%) se encuentra en forma de proteínas de almacenamiento, principalmente globulinas (Rubio y col., 2004).

Calidad nutricional de las proteínas de leguminosas

La digestibilidad y el valor biológico de las proteínas de leguminosas si se compara con las de origen animal resulta algo inferior (Belitz y Grosh, 1997). Sin embargo, en el caso del garbanzo el contenido de cisteína y metionina es bastante superior al del resto de legumbres, lo que en parte explica la mejor calidad proteica del garbanzo respecto a las demás leguminosas.

Las leguminosas presentan baja digestibilidad proteica debido especialmente a (1) deficiencia de aminoácidos azufrados (principalmente metionina), (2) naturaleza compacta de las proteínas de reserva mayoritarias, (3) presencia de antinutrientes como inhibidores enzimáticos (inhibidores de tripsina y quimotripsina), lectinas y ácido fítico, (4) impedimento estérico de los azúcares que están presentes en la mayoría de las proteínas de reserva (glicoproteínas), (5) presencia de compuestos fenólicos, que establecen uniones con las proteínas (enzimas digestivas incluidas) afectando al grado de proteólisis, (6) presencia de minerales, mediadores entre las interacciones de fitatos y proteínas, formando complejos proteína-fitato-mineral resistentes a la proteólisis, (7) interacciones proteína-proteína: las proteínas solubles en agua (fracción de albúminas) interactúan con las proteínas de reserva, provocando un descenso de la velocidad de proteólisis, (8) baja digestibilidad de las proteínas solubles en agua, y finalmente (9) debido al descenso de la actividad proteolítica por interferencias físicas como consecuencia de la presencia de fibra alimentaria (Aguilera, 2009).

Las alergias relacionadas con el consumo de legumbres son poco comunes en humanos, debido a la baja capacidad alergénica de las proteínas de almacenamiento (Lallés y Peltre, 1996). Asimismo, estudios referentes a modificaciones proteolíticas y enriquecimientos con metionina procedentes de proteína de soja, revelan una reducción de la alergia y una mejora en el valor alimentario del producto derivado de soja (Hajós y col., 1996).

Perspectivas en la utilización de proteínas de leguminosas

Actualmente la aplicación de distintas tecnologías ha permitido la obtención de productos con una elevada cantidad de proteína. Los concentrados y aislados proteicos más extendidos son los de soja (Henn y Netto, 1998; Friedman y Brandon, 2001). Los concentrados proteicos se emplean empleados por la industria alimentaria ya que ofrecen ventajas económicas, nutricionales y funcionales, manteniendo las cualidades sensoriales deseables y necesarias para la aceptación por el consumidor. Las aplicaciones más importantes son como mejoradores en la industria cárnica (sustitutos o complementos de la proteína animal), en fórmulas infantiles (Fernández-Quintela y col., 1993; Vioque y col., 2001) y también para mejorar la textura de los productos de panadería y pastas o en el procesado de quesos (El-Sayed, 1997).

Estudios recientes han atribuido a las proteínas de leguminosas propiedades nutraceuticas, por sus efectos beneficiosos en la salud, principalmente su papel protector frente a determinadas enfermedades (Duranti, 2006). Existen algunos estudios que relacionan fracciones específicas de proteínas, con la reducción del colesterol en sangre y los niveles de triglicéridos (Fukui y col., 2002). Además las proteínas de leguminosas se

han visto asociadas a la reducción del riesgo cardiovascular como es el caso de la soja (Anderson y Major, 2002), a un efecto anticarcinogénico como consecuencia de la presencia de lectinas e inhibidores de proteasa en distintas legumbres (Clemente y col., 2004), a la prevención de obesidad y diabetes debido a la acción del inhibidor de α -amilasa (Suzuki y col., 2003; Muri y col., 2004; Oneda y col., 2004) y a una capacidad de transporte de minerales que mejoran su absorción, en lupino, por la presencia de α -conglutina (Duranti y col., 2001).

Por todo lo expuesto, las proteínas de las leguminosas pueden tener un papel muy destacado en la industria alimentaria tanto en alimentos procesados como en la elaboración de nuevos productos texturizados destinados al consumo humano.

III.2.2 CARBOHIDRATOS

Los carbohidratos pueden clasificarse por su grado de polimerización e inicialmente pueden dividirse en tres grupos principales: azúcares, oligosacáridos y polisacáridos (Figura III.8).

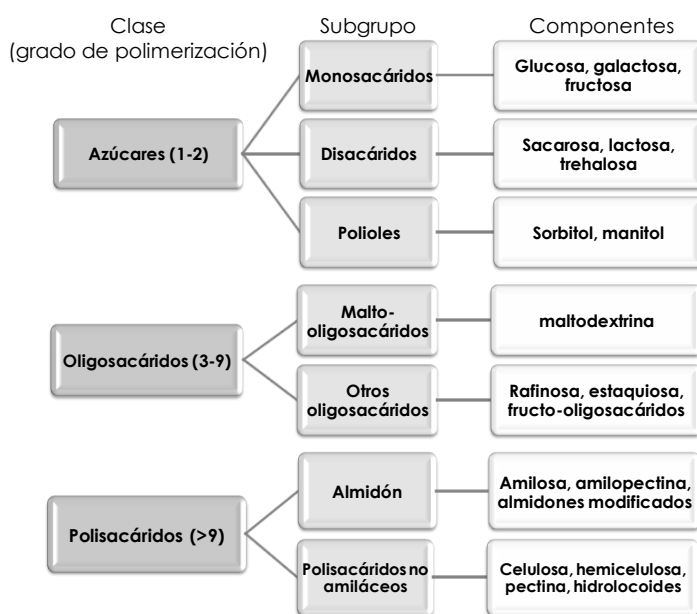


Figura III.8 - Clasificación de los carbohidratos.

El progreso en la química de los carbohidratos ha permitido el desarrollo de una variedad de nuevos productos alimenticios, muchos de los cuales se basan en una mejora de las características nutricionales. Los carbohidratos no son solamente una fuente energética, sino que también desempeñan otras funciones. Tal vez el mayor impacto del

conocimiento reciente se deba a nuestra creciente comprensión de las diversas funciones fisiológicas que poseen los carbohidratos, dependiendo en gran medida del lugar, velocidad y grado de digestión y fermentación en el intestino. Esto está conduciendo hacia nuevas aproximaciones dietéticas, no sólo para una nutrición mejor, sino también para un mejor estado de salud. En los últimos años se ha aumentado el nivel de comprensión de la influencia de los carbohidratos en el rendimiento físico, por su capacidad de almacenamiento de glucógeno (FAO, 1999). El valor nutritivo de las leguminosas se debe especialmente a su aporte en carbohidratos, siendo el almidón el polisacárido mayoritario (Salunkhe y Kadam, 1989).

III.2.2.1 Almidón

Como carbohidrato de reserva, el almidón se encuentra en especial abundancia en determinados tejidos vegetales, como tubérculos y cotiledones de las semillas. El almidón es la forma principal de almacenamiento de glucosa en la mayoría de las plantas. Sirve de almacén de energía en las plantas, liberando energía durante el proceso de oxidación en dióxido de carbono y agua. Los gránulos de almidón de las plantas presentan un tamaño, forma y características específicos del tipo de planta en que se ha formado el almidón.

El almidón es un carbohidrato complejo variable desde el punto de vista metabólico, con distintas formas, algunas de las cuales son rápidamente absorbidas y poseen un elevado índice glucémico y otras, en cambio son resistentes a la digestión. El almidón es el principal constituyente de las leguminosas, a excepción de las semillas de soja, cacahuetes y altramuces. Constituye la mayor reserva de polisacáridos de las plantas superiores y representa el 51-67% en judías, 25-50% en guisantes y 40-57% en lentejas (Salunkhe y Kadam, 1989).

El almidón se encuentra localizado dentro de unos pequeños gránulos (Figura III.9) que presentan estructura cristalina, observado por microscopía con luz polarizada. Estos gránulos no son solubles en agua fría, aunque pueden absorber cierta cantidad de agua originando un pequeño hinchamiento. Si son sometidos a altas temperaturas experimentan un aumento de la viscosidad, debido a la formación de un gel por la adhesión de unos gránulos a otros.

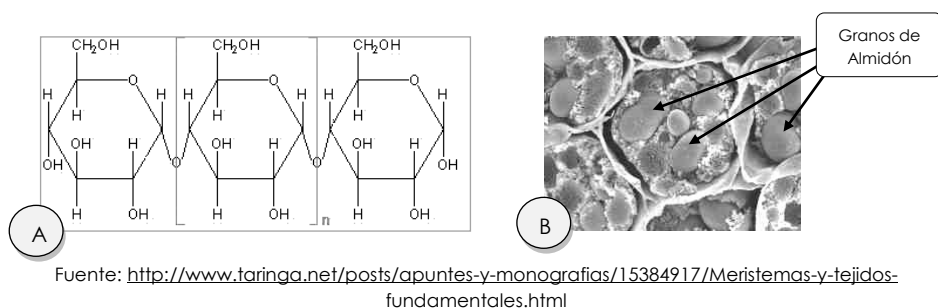


Figura III.9 – (A) Estructura del almidón. (B) Granos de almidón en células de semilla de lenteja.

Los gránulos de almidón no dañados son insolubles en agua y están formado por una mezcla de dos polímeros de la glucosa: la amilosa, polisacárido no ramificado que presenta configuración helicoidal; y la amilopectina, que es un polímero muy ramificado y con un mayor peso molecular (Figura III.10A y B). La amilopectina constituye el 75% del almidón común, pero ambas están formadas por unidades de glucosa unidas entre sí por enlaces glicosídicos $\alpha(1-4)$, salvo en los puntos de ramificación de la amilopectina, donde los enlaces son $\alpha(1-6)$. Asimismo, la amilosa es soluble en agua y más fácilmente hidrolizable que la amilopectina, siendo más fácil romper su cadena para liberar las moléculas de glucosa. Junto a la amilosa y amilopectina, se encuentran también cantidades variables de sales minerales, proteína y compuestos lipídicos (Vasanathan y Hoover, 1992). Sus propiedades funcionales vienen determinadas por la organización de estas macromoléculas en la estructura granular y por la relación amilosa/amilopectina que se establece en el gránulo de almidón.

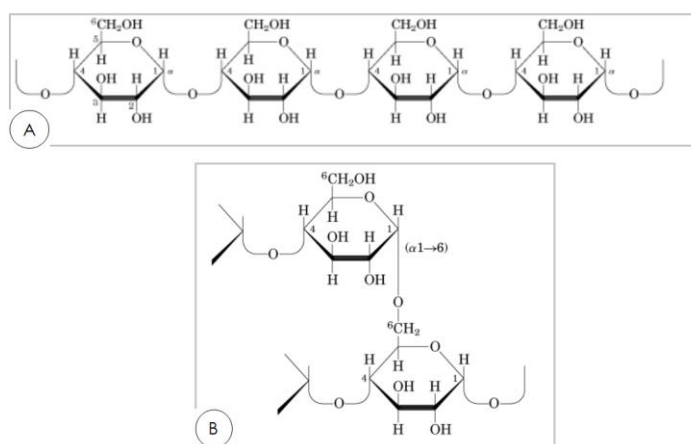


Figura III.10 – (A) Estructura amilosa. (B) Estructura amilopectina.

Las principales enzimas degradativas del almidón son α -amilasa y β -amilasa. La α -amilasa es una endohidrolasa que rompe los enlaces $\alpha(1-4)$ interiores resultando cadenas de glucanos (glucosas unidas de distinta longitud) y dextrina. La β -amilasa rompe enlaces $\alpha(1-4)$ desde el extremo separando maltosas, que están compuestas por dos unidades de glucosa (Figura III.11). La enzima α -amilasa, presente en la saliva, inicia la degradación del almidón, principal fuente de carbohidratos de la dieta humana. La alta concentración de protones del estómago inactiva la α -amilasa salival. La digestión del almidón continúa en el intestino delgado por la acción de la α -amilasa pancreática, formándose como producto una mezcla del disacárido maltosa, el trisacárido maltotriosa y oligosacáridos conocidos como dextrinas.

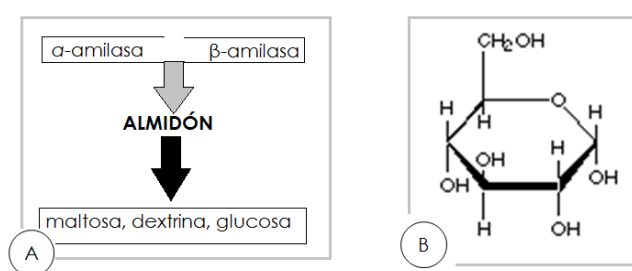


Figura III.11 – (A) Productos de la hidrólisis del Almidón (maltosa, dextrina y glucosa). (B) Estructura de la glucosa.

Principales usos del almidón en la alimentación

La producción de almidón procedente de legumbres es todavía pequeña si se compara con la producción total de almidón, la cual se sitúa en torno a los 6 millones de toneladas anuales (Aguilera, 2009). Sin embargo, las características que poseen los almidones que provienen de legumbres, y particularmente el contenido de amilosa, ofrecen un amplio potencial para nuevas aplicaciones, tanto para uso no alimentario como para nutrición humana.

Además del papel que desarrolla en la contribución energética, el almidón es el mayor responsable de la textura y las propiedades organolépticas que presentan muchos alimentos. Cabe destacar la capacidad de gelificación que posee y las propiedades relacionadas con ésta, como el comportamiento de fluido y envoltorio o suspensión de alimentos. En el campo de la agroquímica y las industrias farmacéuticas se utilizan almidones de legumbres como agentes de encapsulación o de cubierta para la elaboración de tabletas (Duranti, 2006).

Los efectos beneficiosos asociados con el consumo de legumbres están relacionados con la lenta digestión del almidón y el alto contenido de polisacáridos no amiláceos y

almidón resistente (Jenkins y col., 1981; Hughes, 1991; Eastwood y Morris, 1992; Truswell, 1992; Schneeman, 1994). Las leguminosas se consideran excelentes fuentes de almidón de digestión y asimilación lenta, beneficiosa para la salud al incrementar poco la glucemia posprandial si se compara con el almidón de digestión rápida

Almidón Resistente (AR)

Se define como almidón resistente al "*almidón y productos de degradación del almidón, no absorbidos en el intestino delgado de personas sanas*" (Olmedilla-Alonso y col., 2010). Mientras que el almidón fácilmente digerible es disociado por las amilasas del páncreas en 20 minutos, aproximadamente, el tiempo de degradación puede durar más de dos horas en el caso del almidón resistente. En el intestino grueso es donde se produce su fermentación de forma más o menos completa por la microflora; durante este proceso, además de metano, hidrógeno y dióxido de carbono, se forman ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (ácidos acético, propiónico y butírico), con lo que no sólo se reduce el pH en el intestino grueso, sino que, como consecuencia de ello, también aumenta la cantidad de agua en las heces (Cummings y Macfarlane, 1991). Recientes estudios han investigado el papel de los AGCC en la salud, donde se les ha atribuido diversos efectos fisiológicos beneficiosos en las enfermedades de colon, debido a su rápida absorción en la mucosa del intestino (Aguilera, 2009). Se ha visto que la cantidad de almidón que alcanza el intestino grueso puede ser de 4 a 5 g/día, aunque en países donde la ingesta de carbohidratos es mayor, esta cantidad puede ser más elevada. Este almidón se comporta en el colon como un sustrato importante para la fermentación bacteriana colónica (Escudero y González, 2006).

Respecto a la formación del almidón resistente, se requiere una longitud de cadena mínima de 30-40 unidades de glucosa. El porcentaje de amilosa está directamente correlacionado con el AR, cuanto mayor es el contenido de amilosa, mayor contenido de AR. Mientras que la longitud de las cadenas de amilosa promueve la formación de AR, la presencia de lípidos impide su producción, debido a la creación del complejo almidón-lípido (Champ y col., 1999). Las características de no digestibilidad que se le atribuyen, se deben en parte a las fuertes interacciones macromoleculares que se establecen entre las largas cadenas de amilosa y las cadenas ramificadas de la amilopectina. La proporción en la que se encuentra el almidón resistente en los alimentos no sólo varía dependiendo del tipo de alimento analizado, sino del tratamiento térmico al que fue sometido. Por tanto, las formas principales del almidón resistente son (Fuentes-Zaragoza y col., 2010):

- AR1 - almidón físicamente incluido dentro de las estructuras celulares intactas, que se encuentra inaccesible físicamente. Se encuentran en granos parcialmente molidos y semillas.
- AR2 - gránulos de almidón crudo o nativos. No puede ser atacado enzimáticamente si antes no se gelatiniza. Se encuentra en las patatas crudas, plátano verde y maíz.
- AR3 - amilosa retrogradada en los alimentos preparados. Los almidones de los alimentos se pueden volver parcialmente indigeribles por procesos físicos o químicos y por enfriamiento. Sus fuentes son pan, copos de cereales, patatas cocidas y enfriadas y alimentos precocinados (Escudero y González, 2006).
- AR4 - almidón modificado químicamente. Se encuentra en los alimentos procesados como pasteles, aliños industriales y alimentos infantiles.

Las legumbres son una de las principales fuentes de almidón resistente AR1, ya que la gruesa pared celular que tienen hace que el almidón sea inaccesible al ataque enzimático.

III.2.2.2 Fibra alimentaria y Pared Celular

Históricamente, la investigación sobre la fibra se ha concentrado más en el contenido presente en los alimentos que en el estudio del tipo de fibra. Posteriormente se han llevado a cabo estudios más amplios empleando técnicas *in vitro*, para evaluar el efecto agudo y a largo plazo del consumo de fibras. Todos han demostrado que diferentes fuentes de fibra pueden tener diferentes efectos metabólicos y fisiológicos. Las propiedades físico-químicas y la fermentación de la fibra alimentaria determinan sus efectos fisiológicos y el impacto metabólico de su consumo.

La fibra alimentaria es una mezcla compleja de carbohidratos que están asociados a otros componentes distintos de éstos (proteínas, ceras, saponinas o fitoesteroles) (CAC, 2006). El término "fibra" se mencionó por primera vez a comienzos del siglo XIX, aunque referido exclusivamente a forrajes de animales.

Sin embargo, en 1953 se utilizó por primera vez el término "Fibra Alimentaria" (FA) como tal, por Hipsley para referirse a "*aquel material derivado de la pared celular vegetal que permanece en las heces*". Posteriormente, Trowell (1974) adoptó el término definiéndolo como "*el esqueleto que queda de las paredes celulares de los productos vegetales, presentes en nuestra dieta, que es resistente a la acción hidrolítica de las enzimas digestivas del hombre*". Esta definición implica que la fibra procede, principalmente, de las paredes celulares vegetales, sin embargo, no incluye una serie de polisacáridos no digeribles presentes en algunos alimentos y aditivos alimentarios, tales como gomas vegetales, pectinas, celulosa y almidones modificados. Por ello, Trowell y col. (1976)

ampliaron la definición para incluir *"todos los polisacáridos, más la lignina, presentes en la dieta, que no son hidrolizados por las enzimas digestivas del hombre"*.

Hasta el momento se sabe que el único polisacárido digerible de las plantas es el almidón; en consecuencia, según esta definición el término fibra alimentaria se refiere, principalmente, a los polisacáridos distintos del almidón presentes en la dieta. Con posterioridad, se han ido proponiendo nuevas definiciones del término fibra alimentaria, como la de Eastwood en 1992, así como la de Bravo y col. (1995) en la que se incluyen los oligosacáridos, polisacáridos, polifenoles, almidón y proteínas resistentes al ataque enzimático.

No obstante, es difícil encontrar los términos exactos para definir la fibra alimentaria, no sólo por los componentes de ésta, sino también porque debe responder a sus propiedades físico-químicas y sus beneficios fisiológicos. Las definiciones más recientes proceden de la "American Association of Cereal Chemists", del "US Institute of Medicine", de la "Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments", del "Codex Alimentarius Commission" y del "Health Council of The Netherlands". Estas definiciones incluyen el efecto fisiológico de la fibra alimentaria, aunque con diferente enfoque (Gray, 2006). Destaca Health Council of The Netherlands (2006) que define: *"La fibra alimentaria es un conjunto de sustancias que no se digieren ni se absorben en el intestino delgado humano, que tienen estructura química de carbohidratos, compuestos análogos a éstos, así como lignina y sustancias relacionadas"*.

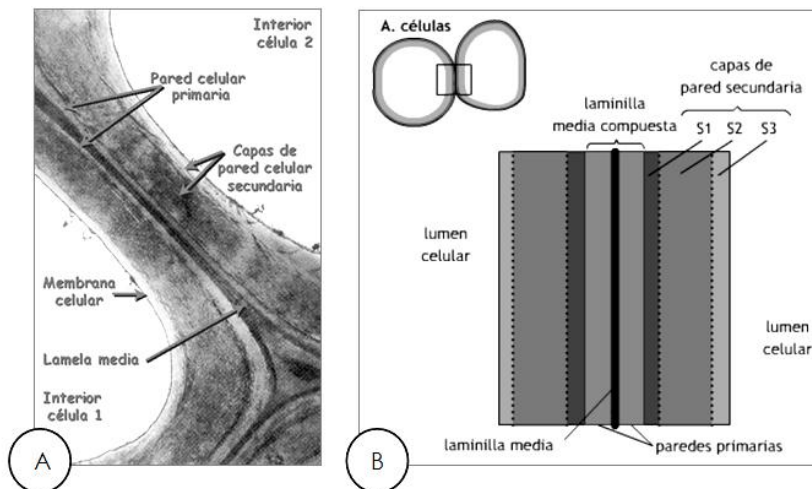
Últimamente el concepto de fibra alimentaria ha cambiado considerablemente, y ahora ya se admite que la fibra está compuesta por algunas sustancias que presentan un papel importante sobre la salud. De momento aún no existe una definición totalmente aceptada ni a nivel europeo ni mundial, sin embargo existe un consenso acerca de que la definición debe incluir el papel fisiológico de la fibra alimentaria (Gray, 2006).

Pared Celular

El origen fundamental de la fibra alimentaria es la pared celular de los vegetales. Este origen tiene una gran importancia, ya que sus componentes son los constituyentes de la fibra, y además sus estructuras y enlaces determinan los efectos fisiológicos de la fibra (Selvendran y col., 1990; Bach Knudsen, 2001; Mateos-Aparicio, 2008). Los componentes principales de la fibra alimentaria proceden de las paredes celulares del material vegetal y comprenden la celulosa, las hemicelulosas y las pectinas, que consisten en una serie de polisacáridos, a menudo asociados o sustituidos con proteínas y compuestos fenólicos en algunas células. La lignina, un compuesto no carbohidrato de la pared celular, también suele incluirse como componente de la fibra alimentaria.

La pared celular vegetal es una estructura común a todos los productos vegetales, su composición varía entre especies, entre tejidos de una misma especie y entre células. Tiene una estructura compleja, con propiedades que dependen del tipo de tejido y etapa de desarrollo del vegetal. Las características físicas y funciones biológicas de las paredes celulares dependen principalmente de los polímeros estructurales constituyentes y de cómo interactúan entre sí para formar la matriz de la pared.

Las paredes celulares pueden variar entre sí en grosor, sustancias embebidas, estructura y frecuencia de punteaduras y plasmodesmo (canales que conectan las células vecinas). Variaciones en la estructura de una única célula reflejan la polaridad y las diferentes funciones de la célula y surgen por la secreción dirigida de componentes de la pared hacia la superficie celular. A pesar de esta diversidad en la pared celular se pueden distinguir tres partes. Durante la división celular se deposita la primera capa originando la lámina media, formada fundamentalmente por polisacáridos pécticos, que mantiene la unión entre las células adyacentes, y por proteínas diferentes en comparación con el resto de la pared. El material depositado entre la lámina media y la membrana plasmática, es la pared celular primaria, de escaso grosor (0,1-1,0 μm). En muchos tipos de células sólo aparecen estas dos capas (Azcon-Bieto y Tálon, 2008).



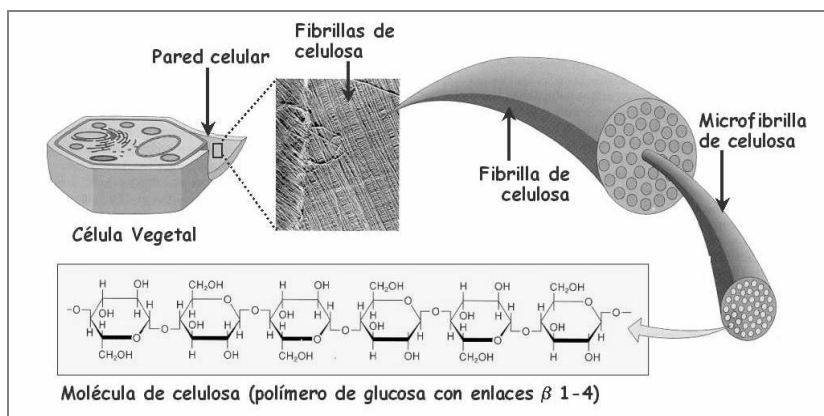
Fuente: <http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas/Pared%20celular%20ampliada.htm#Estructura>

Figura III.12 - (A) Composición de la pared celular vegetal. (B) Capas de la pared vegetal secundaria.

Una vez finalizado el crecimiento, se depositan nuevas capas de material en la cara interna de la pared celular, que constituyen la pared celular secundaria, más gruesa que la pared primaria (Figura III.12A). Pueden llegar a estar altamente especializadas en estructura y composición, y reflejan los estados celulares diferenciados. La pared

secundaria está compuesta por celulosa, hemicelulosas, sustancias pécticas y lignina, y está formada por tres capas: S1, S2 y S3 (Azcon-Bieto y Tálon, 2008; Mateos-Aparicio, 2008) (Figura III.12B).

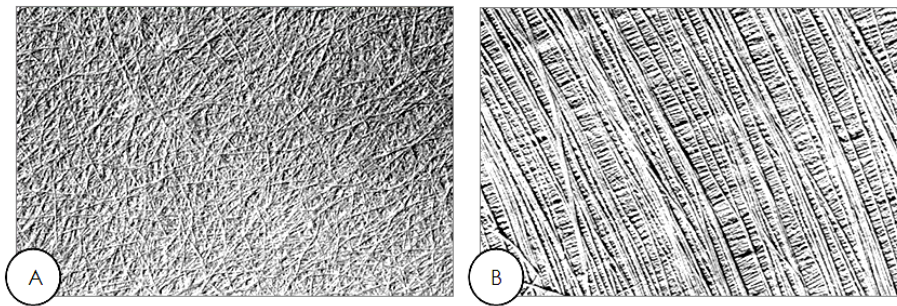
Sin embargo, todavía es necesario alcanzar un conocimiento profundo de la estructura de la pared celular, y aunque la estructura química de los componentes individuales está muy definida, sus proporciones relativas se conocen menos. En general, se considera que la pared está constituida por dos fases la fase fibrilar o esqueleto, y la fase amorfa o matriz. La pared celular es una estructura sumamente organizada, formada por una red tridimensional de microfibrillas de celulosa (Figura III.13) embebida en una matriz constituida por polisacáridos (hemicelulosas y pectinas), proteínas y fenoles en una solución ligeramente ácida (Azcon-Bieto y Tálon, 2008). Por lo tanto, los componentes estructurales de la pared celular de los vegetales son los constituyentes fundamentales de la fibra alimentaria.



Fuente: <http://www.evita.upv.es/varios/biologia/Temas/Pared%20celular%20ampliada.htm#Estructura>

Figura III.13 – Estructura de la pared celular.

La fase fibrilar está formada por celulosa, cuyas cadenas lineales de glucosa pueden alcanzar 4 μ m de longitud. En la pared primaria las fibrillas de celulosa están entrelazadas, dispuestas aparentemente al azar, mientras que en la pared secundaria se disponen paralelamente (Figura III.14A). La separación de la pared secundaria en capas resulta principalmente de la orientación de las fibrillas (Figura III.14B) (Azcon-Bieto y Tálon, 2008).

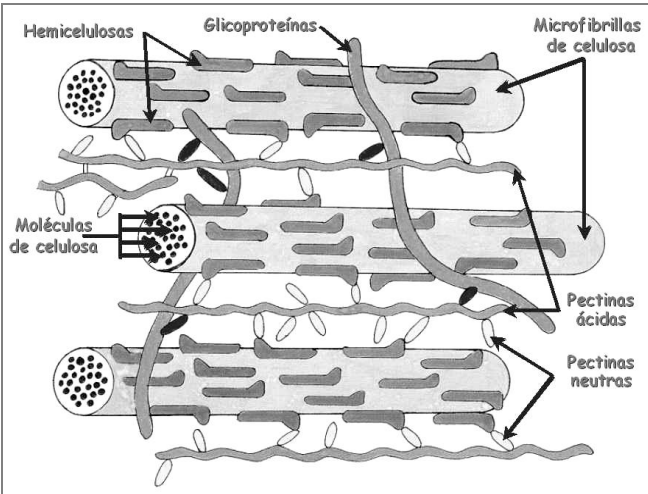


Fuente: <http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas/Pared%20celular%20ampliada.htm#Estructura>

Figura III.14 – (A) Pared Celular Primaria, microfibrillas de celulosa (disposición desordenada, entrelazadas). (B) Pared Celular Secundaria, microfibrillas de celulosa (disposición ordenada).

La pared primaria está formada por las células en crecimiento, y normalmente se considera que están relativamente poco especializadas y que tienen una arquitectura celular bastante similar en todas ellas. Está compuesta fundamentalmente por hemicelulosas y parte de celulosa. En este tipo de paredes celulares las microfibrillas de celulosa están embebidas en una matriz altamente hidratada. Esta estructura proporciona fuerza y flexibilidad al mismo tiempo. En la pared primaria es dominante la matriz amorfa, mientras que la fase fibrilar está reducida (8-25%).

En la pared secundaria domina la fase fibrilar, y la matriz amorfa está formada por hemicelulosas y lignina, mientras que apenas hay sustancias pécticas y sólo una pequeña cantidad de proteínas estructurales (glicoproteínas). Las hemicelulosas revisten las fibrillas de celulosa y cristalizan con ella, uniéndolas, mientras que las sustancias pécticas están unidas entre sí mediante puentes de Ca^{++} (Figura III.15). Las proteínas de la pared son ricas en serina e hidroxiprolina, y están unidas a arabinosa, glucosa y galactosa. Se cree que dichas glicoproteínas actúan como elementos estructurales, porque forman cadenas que pueden asociarse a otros componentes (Taiz y Zeiger, 2006).



Fuente: http://www.biologia.edu.ar/plantas/cell_vegetal.htm

Figura III.15 – Matriz de la pared celular (Raven y col., 1991).

La pared celular de las diferentes leguminosas revela una estructura rica en pectinas, que contiene principalmente el azúcar arabinosa (Tabla III.3). En un estudio con pared celular de cotiledones de guisantes, se observó que estaba compuesta en gran medida de sustancias pécticas y hemicelulosa, mientras que su tegumento se componía fundamentalmente de celulosa (Shiga y col., 2003).

Tabla III.3 - Principales componentes estructurales de las paredes celulares vegetales.

Grupo	Subgrupo	Monómero más abundante
Celulosa		microfibrillas de 1-4 β -D-glucosa
Hemicelulosas	Xiloglucanos	β -D-glucosa, α -D-xilosa, β -D-galactosa
	Xilanos	β -D-xilosa, α -L-arabinosa, α -D-glucoronato
	Glucomanano	
	Arabinoxilano	
	Calosa	β -D-glucosa
Pectinas	β -D(1-3),(1-4) glucano	β -D-glucosa
	Homogalacturonano	α -D-galacturonato, α -L-ramnosa
	Ramnogalacturonano	α -D-galacturonato, α -L-ramnosa
	Galactano	α -D-galacturonato

Fuente: Taiz y Zeiger (2006).

Clasificación de la Fibra Alimentaria

A lo largo del tiempo se han desarrollado numerosos métodos con el fin de estimar de forma cuantitativa la fibra total de los alimentos con un grado razonable de fiabilidad y reproducibilidad. Sin embargo, aún no existe un acuerdo internacional que defina y elija

un método adecuado para analizar la fibra alimentaria, por lo que existe una diversidad de métodos para aislar y fraccionar el grupo de sustancias que la conforman.

Actualmente McCleary y col. (2010) desarrollaron un nuevo método basado en los principales métodos oficiales de AOAC: 985.29 (Prosky y col., 1992), 991.43 (Lee y col., 1992), 2001.03 (Gordon y Okuma, 2002) y 2002.02 (McCleary y Monaghan, 2002), para incluir la determinación de oligosacáridos no-digeribles y almidón resistente en el elevado peso molecular de la fibra soluble y insoluble.

La clasificación de la fibra alimentaria aún no queda claro de todo y puede realizarse atendiendo a distintos factores. Una primera clasificación se puede realizar en función de la solubilidad de la fibra, lo que la divide en fibra insoluble y fibra soluble. Además, se puede clasificar la fibra según su grado de fermentación en el intestino humano, lo que da lugar a grupos claramente diferenciados, el de las fibras totalmente fermentables y el de las parcialmente fermentables. En la actualidad los dos conceptos más aceptados en torno a la fibra son: fibra fermentable, soluble y viscosa; y fibra parcialmente fermentable, insoluble y no viscosa (García-Peris y Velasco-Gimeno, 2007). Sin embargo, la separación entre las dos fracciones, soluble e insoluble, no es muy clara desde un punto de vista químico, dependiendo de las condiciones de extracción. Además, las diferencias fisiológicas no son, de hecho, tan distintas existiendo una gran parte de fibra insoluble que fermenta rápida y completamente, a la vez que no toda la fibra soluble, posee efectos sobre la absorción de glucosa y de lípidos.

Desde el punto de vista químico, una parte de la fibra alimentaria se califica como soluble; se trata de los polímeros que presentan una cierta hidrofilia (pectinas y algunas hemicelulosas), mientras que otros son insolubles (celulosa y compuestos lignocelulósicos) (Figura III.16).

Fibra	Lignina		Insoluble en agua (FIBRA INSOLUBLE)
	Polisacáridos no almidónicos	Celulosa Hemicelulosa	
	Polisacáridos no almidónicos	Hemicelulosa Pectinas Gomas Mucilagos Otros Polisacáridos	Soluble en agua (FIBRA SOLUBLE)
Inulina			En su mayoría soluble en agua
Fructooligosacáridos			
Almidón resistente			
Azúcares no digestibles			
Sustancias análogas a la fibra			

Figura III.16 - Clasificación y composición de la fibra en función de su solubilidad en agua (Escudero y González, 2006)

Componentes de la Fibra Alimentaria

Los componentes de la fibra alimentaria pueden ser clasificados en cuatro grupos principales: polisacáridos y oligosacáridos no digeribles, carbohidratos análogos, lignina y otras sustancias asociadas de las plantas, como se muestra en la Figura III.17.

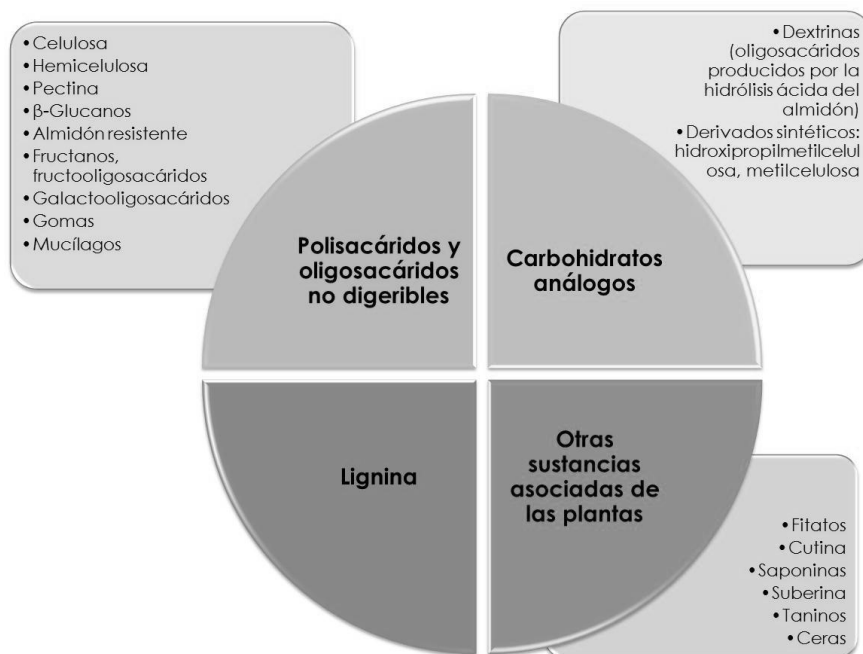


Figura III.17 – Composición de la fibra alimentaria (AACC, 2001).

La fibra alimentaria como una clase de compuestos incluye a una mezcla de polímeros de carbohidratos, entre oligosacáridos y polisacáridos, celulosa, hemicelulosa, sustancias pécticas, gomas, almidón resistente, inulina, que puede estar asociada con lignina y otros componentes no polisacáridos (polifenoles, saponinas, cutina, fitatos, proteína resistente). Solamente son explicados en los próximos apartados los componentes que tienen mayor relevancia en el presente trabajo:

Celulosa → Componente más abundante de las paredes celulares de las plantas superiores (Lineback, 1999; Mataix y Gassull, 2002). Es un polímero lineal no ramificado de alto peso molecular formado por unidades de D-glucosa unidas por enlaces $\beta(1-4)$ (Figura III.18), lo que proporciona una configuración extendida y rígida que no puede ser degradada por las enzimas del intestino humano. La celulosa es un compuesto muy higroscópico, se hincha pero no se disuelve en agua ni en la mayoría de los disolventes. La importancia de la celulosa en la alimentación reside en su insolubilidad e indigestibilidad. Constituye un componente principal de la fibra y, junto a las

hemicelulosas, estimula los movimientos peristálticos del intestino e influye de forma especial en el tiempo de tránsito de los alimentos por el tracto gastro-intestinal (Baltes, 2007).

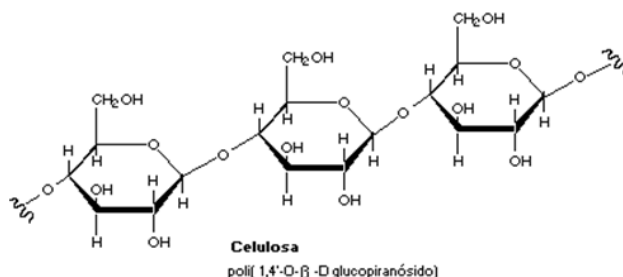


Figura III.18 – Estructura de la celulosa.

Hemicelulosas → Son polisacáridos flexibles que se unen de forma característica a la superficie de la celulosa. Pueden formar entramados que mantienen a las microfibrillas de celulosa juntas en una red cohesiva (Taiz y Zeiger, 2006). Son polisacáridos de estructura compleja y composición química heterogénea que, junto con la celulosa, constituyen los polisacáridos mayoritarios de la pared celular. En general, son polímeros con una cadena principal plana de azúcares con enlaces β(1-4), de la que puede salir un número variable de ramificaciones laterales cortas. Además, se caracterizan por no formar agregados cristalinos, y por tanto su estructura es menos rígida que la de la celulosa.

Las hemicelulosas no se digieren en el intestino delgado humano, aunque sí se degradan parcialmente en el colon por la acción de la microbiota intestinal. Se pueden clasificar en hemicelulosas neutras que incluyen pentosanas de arabinosa y xilosa, y hexosanas de galactosa, manosa y glucosa; y hemicelulosas ácidas, donde aparecen los ácidos galacturónico y glucurónico. Los principales azúcares que la constituyen son de la serie D, xilosa, galactosa, manosa, glucosa, ácido galacturónico, y de la serie L, arabinosa, ramnosa y fructosa, y los polímeros hemicelulósicos más abundantes y distribuidos son los xilanos, los β-glucanos y los xiloglucanos (Lineback, 1999). Las diferencias en la composición química hacen que presenten distintas propiedades físicas y químicas, de manera que en este grupo existen componentes solubles e insolubles (Lineback, 1999; Mataix y Gassull, 2002; Gray, 2006).

Sustancias pécticas → Los polisacáridos pécticos de la pared celular de las plantas se encuentran entre los polímeros más complejos conocidos, y están implicados en varias funciones vitales de la planta. Son polisacáridos que se caracterizan por su solubilidad en agua caliente y formación de geles cuando son sometidos a cocción. Forman una fase

gelatinosa hidratada en la que la red de celulosa-hemicelulosa está embebida. Están formados por sustancias asociadas a las hemicelulosas en las paredes celulares que actúan como relleno hidrofílico, para evitar la agregación y el colapso de la red de celulosa, es decir, llenan los espacios intercelulares en tejidos jóvenes y proporcionan firmeza y textura a frutas y hortalizas. Al igual que las hemicelulosas, la pectinas incluyen varias clases diferentes de polisacáridos. Son una mezcla compleja de polisacáridos coloidales cuyos principales constituyentes son los ramnogalacturonanos (I y II), consistentes en cadenas de ácido D-galacturónico unidos por enlaces $\alpha(1-4)$ con residuos interpuestos de L-ramnosa. Estos polímeros pueden aparecer parcialmente esterificados con grupos metilo (pectinas) o libres (ácidos pécticos, principalmente ácido galacturónico). Las unidades de ácido galacturónico de forma libre pueden estar ionizados y unidos a minerales como calcio y magnesio, o como metil-éster, que pueden no estar ionizados (Gurr y Asp, 1996). Además, pueden presentar cadenas laterales, siendo los azúcares neutros más comunes la D-galactosa y la L-arabinosa, que se asocian al ramnogalacturonano, formando cadenas de galactanos, arabinanos y arabinogalactanos (Lineback, 1999). La solubilidad en agua de las sustancias pécticas depende del grado de polimerización, presencia de cadenas laterales y de grupos metilo, así como la distribución de éstos.

Proteínas → En mayor proporción se encuentran las proteínas estructurales y las enzimáticas. Las proteínas enzimáticas son sintetizadas en el citoplasma y secretadas a la pared, ya que ésta carece del mecanismo de síntesis de proteínas. Algunas de las glicoproteínas de la pared no tienen asociada actividad enzimática, por lo que se clasifican como proteínas estructurales. Esas proteínas normalmente se clasifican de acuerdo con su composición predominante de aminoácidos. Así, encontramos la glicoproteína rica en hidroxiprolina (HRGP), la proteína rica en glicina (GRP), la proteína rica en prolina (PRP), etc.

Lignina → Es una estructura compleja y se trata de macromoléculas heterogéneas que forman polímeros tridimensionales de alto peso molecular por polimerización oxidativa de alcoholes de la serie fenilpropano (alcohol cumarílico, coniferílico y sinapílico). Forman la estructura de la parte más dura o leñosa de los vegetales, y es totalmente indigerible. La deposición de la lignina se inicia no obstante en la lámina media y afecta finalmente a todas las partes de la pared, llegando a constituir hasta el 30% en peso de la misma. A medida que la lignina se forma en la pared, desplaza el agua de la matriz y forma una red hidrofóbica que se enlaza fuertemente a la celulosa y evita la expansión de la pared. Las células lignificadas son, por tanto, incapaces de dividirse. En la pared vegetal se encuentra unida químicamente a las hemicelulosas y, debido a su influencia sobre algunos aspectos de la fisiología gastrointestinal, se la incluye dentro de la categoría de

fibra alimentaria. Esos efectos fisiológicos que se le atribuyen nunca se han demostrado en el hombre (Mataix y Gassull, 2002).

Propiedades Físico-Químicas de la Fibra Alimentaria

La funcionalidad de los productos ricos en fibra y sus efectos fisiológicos dependen más de las propiedades físico-químicas que presenten que de su composición química (Figuerola y col., 2005). Estas propiedades vienen determinadas por el origen de la fibra, porcentaje de las fracciones soluble e insoluble que la formen, estructura de los tejidos, naturaleza de los compuestos intracelulares, madurez del fruto, procesamiento que hayan sufrido o adición de compuestos (aditivos alimentarios, almidones modificados) que influyen en las características físico-químicas de los alimentos procesados (Guillon y Champ, 2000; Jaime y col., 2002).

Las principales propiedades físico-químicas de la fibra son: tamaño de partícula, propiedades de hidratación, formación de soluciones viscosas, capacidad de retención de compuestos orgánicos, capacidad de intercambio catiónico y capacidad de fermentación (Tabla III.4).

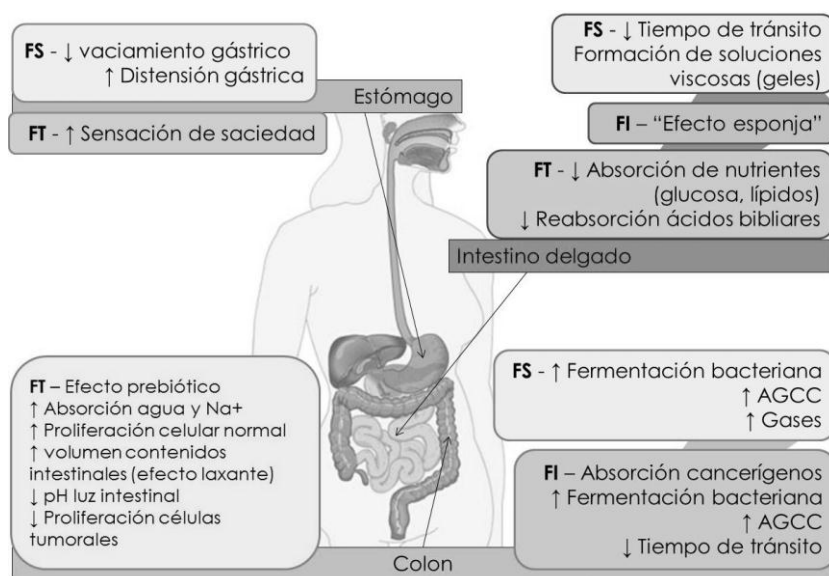
Propiedad físico-química	Características	Efectos	Bibliografía
Tamaño de partícula	Varía entre 350 y 200 µm; Depende del tipo de pared celular; grado de procesado; tracto digestivo	Afecta al tiempo de tránsito, la fermentación y la excreción fecal; Influye en la capacidad de adsorción y retención de sales, en la degradación de los compuestos intracelulares por las secreciones digestivas y en la superficie expuesta a las bacterias	Guillon y Champ, 2000 Jaime, 2000
Propiedades de hidratación:	Afectada por la composición química y las características físicas de la fibra. Depende de los procesamientos de las semillas, pH, fuerza iónica y naturaleza de los iones; constante dieléctrica y temperatura	Inducción de la fermentación., aumento de volumen fecal de fibra alimentaria mínimamente fermentada	Gurr y Asp, 1996 Guillon y Champ, 2000
(a) Capacidad de hinchamiento	Entrada de agua entre las macromoléculas que se expanden hasta que son completamente extendidas y dispersadas; Depende de la composición de la pared celular	Las pectinas aisladas tienen gran capacidad para hincharse	Bach Knudsen, 2001
(b) Capacidad de retención de agua	Capacidad de inmovilizar agua dentro de matriz fibrosa		Guillon y Champ, 2000
(c) Solubilidad	Las pectinas normalmente son solubles en agua, aunque esta solubilidad va a depender del grado de esterificación, así como de la cantidad de cadenas laterales que presenten en su estructura	Los polisacáridos solubles viscosos pueden impedir la digestión y absorción de nutrientes en el intestino. Acciones sobre el metabolismo lipídico. Disminuye la concentración y el tiempo de contacto de potenciales carcinogénicos con la mucosa del colon.	Kin, 2000 Guillon y Champ, 2000
Formación de soluciones viscosas	Los polisacáridos dan soluciones viscosas cuando se disuelven en agua, por esto depende de la naturaleza de las cadenas de polisacárido	Los componentes viscosos pueden retrasar el vaciado gástrico. La absorción en el intestino es más lenta, lo que origina una disminución de la respuesta glucémica en la sangre.	Gurr y Asp, 1996 Bach Knudsen, 2001
Capacidad de retención de compuestos orgánicos	Propiedad de unirse a un gran número de compuestos orgánicos tales como sales biliares, colesterol u otras grasas, carbohidratos, y proteínas, e incluso a sustancias cancerígenas. Depende de la naturaleza química y también de la superficie total accesible, del pH, el tiempo de exposición, y la naturaleza de los ácidos biliares; también del tamaño de las partículas que contienen la fibra alimentaria	Evitan que las enzimas digestivas puedan degradar los compuestos orgánicos y que sean absorbidos a través de la mucosa intestinal; efecto hipocolesterolémico e hipoglucémico	Gurr y Asp, 1996 Thibault y col., 1992 Guillon y Champ, 2000

Tabla III.4 (cont.) - Propiedades físico-químicas de la fibra alimentaria.

Propiedad físico-química	Características	Efectos	Bibliografía
<i>Propiedades hipoglucémicas:</i>	La fibra alimentaria tiene la capacidad de adsorber diferentes sustancias, como la glucosa que repercute en el control de la diabetes.	El consumo adecuado de fibra alimentaria puede reducir la respuesta glucémica.	Ou y col., 2001 Chau y col., 2003 Escalada-Pla y col., 2007
(a) Adsorción de Glucosa	Capacidad que tienen los alimentos ricos en fibra para adsorber glucosa.	La fibra alimentaria puede disminuir la concentración disponible de glucosa en el intestino delgado, evitando que ésta traspase la pared intestinal y llegue a la sangre, reduciendo la glucosa sérica postprandial.	Ou y col., 2001 Chau y col., 2003
(b) Difusión de Glucosa	Retardo de la absorción de la glucosa por el intestino, ya que cuanto mayor es el retardo menor será la cantidad de glucosa difundida durante la digestión.	Provoca el descenso de glucosa postprandial en sangre.	Ou y col., 2001 Chau y col., 2003
(c) Capacidad de Inhibir la Actividad α -Amilasa	El material rico en fibra interfiere sobre la actividad de la enzima α -amilasa.	La reducción en la actividad α -amilasa supone un retardo en la tasa de producción de glucosa	Ou y col., 2001 Chau y col., 2003
(d) Digestibilidad del almidón	Efecto que tienen la fibra sobre la hidrólisis del almidón.	Reduce la producción de glucosa a partir del almidón y, consecuentemente, el descenso de glucosa postprandial en sangre.	Ou y col., 2001 Chau y col., 2003
<i>Capacidad de intercambio catiónico</i>	Presencia de grupos ionizables en la estructura química de la fibra y de sustancias asociadas como el ácido fítico; Depende en mayor parte de la fibra soluble	Disminuye el grado de disponibilidad de algunos cationes divalentes esenciales como hierro, cinc y calcio, como también elementos metálicos potencialmente tóxicos que podrían ser retenidos y eliminados del organismo junto con la fibra alimentaria. Atrapa y desestabiliza la emulsión de los lípidos, lo que produciría un descenso en su difusión, absorción y utilización, incluido del colesterol.	Furda, 1990 Gurr y Asp, 1996 Jaime, 2000 Guillon y Champ, 2000
<i>Capacidad de fermentación</i>	Está relacionada con la concentración en la que estén presentes los polisacáridos, sus propiedades físico-químicas, su solubilidad y estructura, su procesamiento, accesibilidad de las bacterias a estos polisacáridos y la presencia de otros componentes vegetales capaces de inhibir la actividad enzimática. Los polisacáridos solubles, los polioles y los oligosacáridos fermentan rápida y completamente, mientras que el almidón resistente fermenta completamente, aunque de forma lenta, y la celulosa y las hemicelulosas son parcialmente resistentes a la fermentación	Las fuentes de fibra que tengan una alta solubilidad pueden ser rápidamente degradadas por las bacterias. Los productos de la fermentación de la fibra son: ácidos grasos de cadena corta (AGCC), gases (hidrógeno, anhídrido carbónico y metano) y energía. Las bifidobacterias liberan grandes cantidades de ácido láctico que disminuye el pH colónico, controla el crecimiento de bacterias perjudiciales	Bravo y col., 1994 Guillon y col., 2000 Dust y col., 2004 Zarzuelo y Gálvez, 2005 Escudero y González, 2006 Benítez, 2011

Efectos fisiológicos

Los efectos beneficiosos de la fibra han sido atribuidos al papel modificador que ejerce sobre algunas actividades fisiológicas del intestino humano que a su vez influyen en la actividad metabólica del cuerpo. Es en el estómago y en el intestino delgado, donde las propiedades físicas de la fibra alimentaria juegan un papel importante. Por ejemplo, la fibra puede influir en el grado de viscosidad del contenido del estómago, que a su vez puede afectar a la velocidad con que los nutrientes salen del estómago hacia el intestino delgado. La presencia de polisacáridos viscosos puede afectar notablemente al grado de contacto de los alimentos con los sustratos de enzimas que los digieren en el intestino delgado. De esta manera, la fibra puede afectar las tasas de digestión de carbohidratos, y probablemente también de las proteínas y las grasas (Gurr y Asp, 1996). Los efectos fisiológicos aparecen resumidos en la Figura III.19.



Nota: FS – Fibra Soluble; FI – Fibra Insoluble; FT – Fibra Total.

Figura III.19 - Efectos fisiológicos de la fibra (Zarzuelo y Gálvez, 2005).

Los principales efectos beneficiosos atribuibles a un consumo adecuado de fibra es el aumento del bolo fecal, mejorando las funciones del intestino grueso, la disminución de los niveles plasmáticos de colesterol, así como una disminución de la respuesta glucémica. Sin embargo, la disminución de la biodisponibilidad de nutrientes parece ser el único aspecto adverso debido a la ingestión de niveles inapropiados de fibra en la dieta. Los mecanismos de acción no están totalmente definidos, aunque están relacionados con las propiedades físico-químicas de la fibra (Tabla III.5).

La literatura indica numerosos efectos benéficos asociados con el incremento de la ingestión de fibra alimentaria, incluyendo la reducción del riesgo de enfermedades cardíacas, diabetes, obesidad y algunas formas de cáncer (Mann y Cummings, 2009). Salvado de avena y salvado de cebada, ricos en fibra soluble, han recibido una buena reputación por su habilidad en bajar los niveles de lípidos sanguíneos. El salvado de trigo y muchas otras formas de fibra insoluble, se relacionan típicamente con las propiedades laxantes (American Dietetic Association, 2008).

Tabla III.5 - Efectos fisiológicos de la fibra alimentaria.

Efecto fisiológico	Acciones /Bibliografía
<i>Promoción de la saciedad y reducción del consumo de calorías</i>	<p>Más tiempo de masticación, lo que contribuye a la secreción de saliva y jugo gástrico; retrasa el vaciado gástrico, porque distiende las paredes del tracto gastrointestinal, estimulando los reflejos de saciedad y ralentizando la absorción de nutrientes; Provoca el aumento de la saciedad y la disminución de la eficiencia en la absorción en el intestino delgado</p> <p>Holt y col., 2001; Mälkki, 2001; Slavin, 2005; Bornet y col., 2007</p>
<i>Reducción del colesterol sanguíneo</i>	<p>La alta viscosidad del alimento va a limitar el acceso del colesterol a la mucosa intestinal, y los componentes de la pared celular van a dificultar la formación de micelas, lo que impediría la emulsión del colesterol.</p> <p>La pared celular va a actuar como barrera física entre las grasas y las enzimas digestivas en el intestino. La capacidad de intercambio iónico de la fibra alimentaria es, probablemente, mucho más importante en el caso de la absorción de lípidos.</p> <p>Provoca un descenso en la reabsorción de los ácidos biliares y produce un déficit de sus niveles hepáticos lo que hace que aumente su síntesis;</p> <p>Disminuye la síntesis de colesterol en el hígado debido a la reducción de la concentración de insulina en sangre por consumo de fibras viscosas, ya que la insulina se encarga de estimular la enzima limitante en la síntesis de colesterol, hidroximetil glutaril coenzima A reductasa;</p> <p>Produce alteración en la producción de lipoproteínas en el hígado y descenso de las mismas en el torrente sanguíneo, lo que resultaría en un descenso de los niveles totales de colesterol y colesterol LDL, lo que disminuiría el riesgo de enfermedad coronaria</p> <p>Mälkki, 2001; Escudero y González, 2006; Gray, 2006; Benítez, 2011</p>
<i>Efecto de la fibra en la respuesta glucémica</i>	<p>La fibra soluble, generalmente se recomiendan para diabéticos ya que se supone que reducen la respuesta glucémica a los alimentos y por consiguiente, reducir la necesidad de insulina</p> <p>Holt y col., 1996; Chandalia y col., 2000; Guillon y Champ, 2000; AACC, 2001; Rizkalla y col., 2002; Hawkins y Johnson, 2005; Gray, 2006</p>
<i>Prevención contra el cáncer</i>	<p>Dilución y unión a carcinógenos potenciales, disminución del tiempo de tránsito intestinal, cambios en el perfil de sales biliares dentro del colon y producción de AGCC tras la fermentación de la fibra.</p> <p>Reduce el tiempo de tránsito intestinal evita una prolongada exposición de las células colónicas a mutágenos fecales.</p> <p>La fibra puede diluir los ácidos biliares produciendo una fase sólida dispersa, la cual absorbe sales biliares reduciendo su presencia en el agua fecal.</p> <p>La fermentación de la fibra en el colon produce un aumento de AGCC que presentan un papel potencial en la prevención contra el cáncer de colon e infecciones colónicas por varios mecanismos.</p> <p>Bingham y col., 2003; Gray, 2006; Guillon y Champ, 2002; Mussatto y Mancilha, 2007; Guillon y col., 2000; García Peris y col., 2002; Escudero y González, 2006</p>

Efecto fisiológico	Acciones /Bibliografía
Regulación de la función colónica	<p>La fermentación de la fibra por la flora del colon favorece la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), que a su vez promueven la reabsorción de agua y electrolitos, como sodio y cationes divalentes, estimulan el trofismo intestinal, especialmente el butirato que aporta energía, aumenta el flujo sanguíneo del colon, incrementa la secreción pancreática y de otras hormonas gastrointestinales, además de estimular el sistema nervioso autónomo, y el mantenimiento de la función de barrera intestinal.</p> <p>AGCC inhiben el crecimiento de bacterias perjudiciales y estimulan el de la flora intestinal beneficiosa, reducen intolerancias y alergias alimentarias y la producción de compuestos no deseables como aminas, fenoles y ácidos biliares secundarios; fibra insoluble presenta efectos mecánicos que implican el acortamiento del tiempo de tránsito intestinal, mientras que la fibra soluble tiene efectos sistémicos.</p> <p>El aumento de la masa celular microbiana tiene una alta capacidad de retención de agua, causando el ablandamiento de las heces y evitando el estreñimiento.</p> <p>La fibra alimentaria actúa positivamente en casos de diarrea, en el tratamiento de la enfermedad de colon irritable, y parece tener un papel positivo en la diverticulitis y la enfermedad inflamatoria intestinal</p> <p style="text-align: right;">Bennett y Cerda, 1996; García Peris y col, 2002; Escudero y González, 2006; Gray, 2006; Mussatto y Mancilha, 2007</p>

El elevado contenido de fibra de las legumbres es otro de los aspectos de interés para su consumo. Las propiedades físico-químicas de la fibra producen los efectos fisiológicos que se le atribuyen; por un lado las "fibras solubles" forman geles viscosos en el intestino y afectan principalmente a la absorción de glucosa y grasa, y por otro lado las "fibras insolubles" aumentan el volumen fecal, tienen un efecto saciante al incrementar el tiempo de vaciado gástrico y además disminuyen el tiempo de tránsito intestinal, lo que favorece un efecto anticarcinogénico. El alto contenido de fibra de las leguminosas las hacen recomendables en dietas de adelgazamiento y en el control de la *diabetes mellitus* tipo 2 (Gray, 2006).

Adición de fibra a alimentos

La adición de fibra a los alimentos es una alternativa para compensar su deficiencia en la dieta. La aparición de nuevas fuentes de fibras y una mayor comprensión y mejora de su funcionalidad ofrecen nuevas oportunidades en el uso de la fibra en la industria alimentaria.

La complementación con fibra alimentaria puede resultar en la promoción de alimentos bajos en calorías, colesterol y grasa (Elleuch y col., 2011). No todos los tipos de fibra pueden incorporarse de la misma manera (niveles, formas) y en el mismo tipo de alimento. Sus propiedades funcionales son los factores determinantes de su uso. Las propiedades físico-químicas de la fibra alimentaria juegan un papel importante en su funcionalidad. El color y el sabor también tienen importancia. No obstante, se debe tener en cuenta que los productos no deben sufrir alteraciones en su aspecto, textura, aroma

y/o sabor, o al menos en una medida muy pequeña. Ejemplos de alimentos enriquecidos con fibra son pan, galletas, productos lácteos,... aunque también se han encontrado nuevos usos en alimentos como "mousses" enriquecidas, gelatinas o bebidas que emulan a postres sabrosos y nutritivos (Figura III.20).



Figura III.20 – Alimentos enriquecidos en fibra (pan, cereales, leche, tallarines, sumos).

La literatura contiene mucho material sobre la adición de fibra alimentaria en productos como bebidas, carne, masas, sopas, entre otros. Normalmente la fibra es incorporada en productos de repostería para prolongar el frescor del alimento, gracias a su capacidad de retención de agua. Las fibras pueden modificar el volumen del pan, la densidad y la firmeza de la hogaza (Sangnark y Noomhorm, 2004). Otros estudios, específicos para el pan en dietas especiales, demostraron que la adición de fibra alimentaria de maíz y avena en formulaciones libres de gluten resultan en un tipo de pan con alto volumen y ligeros, comparados con el control sin fibra (Sabanis y col., 2009). Soukoulis y col. (2009) encontraron que el uso potencial de fibra alimentaria puede controlar la cristalización y recristalización en productos lácteos congelados.

Consumo y recomendaciones de ingesta

Las estimaciones del consumo de fibra alimentaria dependen de la metodología de análisis elegida por las instituciones gubernamentales de los diferentes países y grupos de investigación, por lo que la comparación del consumo entre distintos países no resulta muy concisa (Tabla III.6). El consumo de fibra alimentaria oscila entre 12 y 29 g/día en los diversos países, existiendo, en general, diferencias de consumo para hombres y mujeres,

ya que la ingesta de alimentos y energía total, normalmente, es menor en mujeres que en hombres (Gray, 2006; Mateos-Aparicio, 2008).

Tabla III.6 - Requerimiento diario de fibra alimentaria establecido por organismos gubernamentales o según grupos de investigación.

Requerimiento de fibra alimentaria (g/día)	Organismo responsable/Bibliografía
18	Department of Health (1991), en Reino Unido,
20-30	Cervera y col. (1999)
30	German Nutrition Society (2000)
25-30	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (2001)
31-38	Institute of Medicine (2002), en Estados Unidos
>25	FAO/WHO (2004)
25-35	Nordic Nutrition Recommendations (2004)
30-40	Health Council of The Netherlands (2006)
21-25	Gray (2006) y Mateos-Aparicio (2008)

En la última década se recomienda el consumo de 25 a 30 g/día de fibra alimentaria. En los países de América Latina, el valor medio está sobre 15 g/día, mientras que en los grandes núcleos de población la ingesta está por debajo de 10 g/día (Cardona-Velásquez, 2004). Muchos nutricionistas y expertos en dietas sugieren que de toda la fibra consumida diariamente, un 20 a 30% debería proceder de la fibra soluble (Escudero y González, 2006; Elleuch y col., 2011).

III.2.3 OTROS COMPONENTES IMPORTANTES

Además de los componentes mayoritarios como proteínas, carbohidratos y fibra, las leguminosas contienen numerosos compuestos bioactivos, presentes en pequeñas cantidades, pero que pueden tener efectos metabólicos y fisiológicos de interés. Algunos de estos componentes (fitatos, galactooligosacáridos, inhibidores de proteasas, lectinas, saponinas, etc.) se han clasificado como factores antinutricionales, pero en numerosos estudios se ha reconsiderado el impacto beneficioso que pueden tener en la salud, por lo que actualmente se los considera compuestos bioactivos (Tabla III.7). Algunos de ellos pueden tener un papel en la prevención de enfermedades como trastornos cardiovasculares, diabetes y cáncer (Champ, 2002; Duranti, 2006).

Tabla III.7 - Efectos positivos y negativos de diferentes componentes bioactivos de las leguminosas.

Componente	Efectos beneficiosos	Efectos perjudiciales
Alfagalactósidos	Prebiótico	Flatulencia
Inhibidores de la tripsina	Anticancerosos, antioxidantes	Reducen la digestibilidad de las proteínas
Lectinas	Anticancerosas	Hemoaglutinación
Fitatos	Antioxidantes, disminuyen el índice glucémico	Alteran la biodisponibilidad de minerales
Fibra (principalmente fibra soluble)	Disminuyen colesterolemia, glucemia y triglicéridos	
Almidón resistente	Mejoran la sensibilidad a la insulina, aumentan saciedad y mejoran el perfil de glucosa e insulina en sangre	

Los contenidos minerales de las leguminosas son altos en general, pero de biodisponibilidad baja debido a que se unen a los fitatos, compuestos que constituyen el principal inhibidor de la absorción de hierro y cinc. Algunas leguminosas tienen además contenidos importantes de polifenoles que inhiben la absorción de hierro. La deficiencia nutricional de hierro alcanza su máxima prevalencia en poblaciones con dietas a base de cereales y legumbres, pero la situación mejora sensiblemente con la adición de proteína animal o por eliminación de los fitatos y degradación de los polifenoles, en cuyo caso las legumbres pueden ser buenas fuentes de hierro y cinc por sus contenidos elevados de estos minerales (Sandberg, 2002).

Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos incluyen un gran número de sustancias sumamente heterogéneas que se caracterizan por poseer un anillo aromático con, al menos, una sustitución hidroxilo y una cadena lateral funcional. Estos compuestos están ampliamente distribuidos en todo el reino vegetal; en las plantas superiores es tal su presencia, que sólo son superados por los carbohidratos (Aguilera, 2009). Casi todos los tejidos de las plantas contienen mezclas complejas de polifenoles, presentándose en estado libre o unidos a hidroxíácidos y azúcares. Los compuestos fenólicos son considerados metabolitos secundarios, porque no poseen un papel reconocido en el mantenimiento de los procesos fundamentales de la vida (crecimiento, desarrollo y reproducción) de los organismos que los sintetizan (Bell, 1981).

Las legumbres poseen diferentes tipos de compuestos fenólicos que varían dependiendo no sólo de la especie sino también de la variedad. Entre este grupo de compuestos los que más se han estudiado en leguminosas son los taninos condensados o proantocianidinas, que hasta hace pocos años eran considerados antinutrientes debido

a su facilidad para combinarse con proteínas, produciendo un aprovechamiento deficiente de dichos nutrientes (Liener, 1994; Bartolomé y col., 2000).

Gracias a los avances en las técnicas analíticas se conoce la distribución de los compuestos fenólicos en productos vegetales en términos cuantitativos y cualitativos (Dueñas y col., 2002). Estudios epidemiológicos han establecido la relación entre el alto consumo de frutas y verduras y la prevención de enfermedades, debido a la presencia de compuestos bioactivos entre los que destacan la vitamina C, vitamina A, carotenoides y polifenoles, considerados agentes reductores que protegen a los tejidos humanos del estrés oxidativo.

Actualmente, los compuestos fenólicos tienen importancia como compuestos bioactivos por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimutagénicas, anticancerígenas, antibacterianas, etc., y por su capacidad para modificar las funciones de algunas enzimas celulares clave. De todos los compuestos fenólicos, el grupo de los flavonoides es el más extendido en la naturaleza y dentro de ellos, los flavonoles son lo que poseen mayor actividad antioxidante (Dueñas y col., 2002).

Actividad antioxidante

Los compuestos fenólicos se incluyen principalmente en la categoría de captadores de radicales libres, aunque también pueden ejercer su acción antioxidante a través de otros mecanismos, como quelantes de iones metálicos que catalizan reacciones de oxidación (Ursini y col., 1999). El efecto protector de estos compuestos está basado en la hipótesis de que los radicales libres, producidos durante los mecanismos de oxidación, están involucrados en los procesos de muchas enfermedades, por lo que los antioxidantes pueden actuar previniendo o retrasando su formación.

Recientemente hay un gran interés sobre la posible influencia de los antioxidantes en diversas enfermedades. Estudios epidemiológicos muestran una correlación entre el consumo de alimentos ricos en compuestos fenólicos y un riesgo reducido de enfermedades cardiovasculares y de ciertos tipos de cáncer, mediante la protección de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) frente a la oxidación y la reducción de la agregación plaquetaria (Shrikhande, 2000; Shahidi, 2002).

Se conoce la importancia de los alimentos vegetales, especialmente de los frutos, como principales fuentes de compuestos fenólicos y consecuentemente, de actividad antioxidante. En este sentido, actualmente se reconocen a las legumbres como fuentes de antioxidantes naturales (Dueñas y col., 2002; Amarowicz y Pegg, 2008). Diversos autores han estudiado la actividad antioxidante en distintos extractos de legumbres y sometidas a diferentes procesos tecnológicos, encontrando actividades antioxidantes

mayores que las esperadas en leguminosas, debido posiblemente a la fracción mayoritaria de flavonoides que presentan estos vegetales (López-Amorós y col., 2006; Xu y col., 2007).

III.3 PROPIEDADES TECNOFUNCIONALES

Las propiedades tecnofuncionales han adquirido una gran importancia debido al incremento en el uso de harinas de leguminosas en el desarrollo de formulaciones alimentarias (Aguilera, 2009). En este sentido, los investigadores han enfatizado la expansión de la utilización de las leguminosas en forma de harinas como ingredientes funcionales.

Las propiedades tecno-funcionales son propiedades físico-químicas que proporcionan información sobre cómo un ingrediente en particular podría comportarse en una matriz alimentaria. Dichas propiedades se establecen por la composición y estructura molecular de los componentes individuales, como carbohidratos y proteínas, y de las interacciones que se establecen entre ellos (Kinsella, 1976). Entre las propiedades tecno-funcionales destacan aquéllas que están relacionadas con el agua, ya que desarrollan un papel importante en los principales cambios que tienen lugar durante el procesamiento de alimentos. Por lo tanto, se puede decir que las propiedades de hidratación, entre las que destacan la capacidad de absorción de agua y la capacidad de retención de agua, influyen directamente en las características que conforman la matriz del alimento (McWatters, 1983).

Capacidad de absorción de agua → es la cantidad de agua que permanece unida al material hidratado tras la aplicación de una fuerza externa. Esta propiedad es de suma importancia en el caso de las legumbres y está directamente relacionada con el tratamiento de cocción, por lo que resulta imprescindible para determinar el comportamiento del alimento durante el procesamiento térmico, ya que ayuda a la separación de las células en los cotiledones de las leguminosas (Aguilera, 2009). Esta característica también se aplica para mantener la textura suave de productos elaborados con harinas de mezclas cereal-leguminosa. Por otra parte, la funcionabilidad de las proteínas puede tener un papel relevante a la hora de mantener la humedad de los alimentos, así como en productos de panadería. La propiedad de absorción de agua es deseable en alimentos como natillas y masa de repostería, por su capacidad de embeber agua sin disolver las proteínas (Seena y Sridhar, 2005). Además, esta propiedad influye en la textura de los productos cárnicos confiriendo consistencia, viscosidad y mayores propiedades de adhesión, por lo que las harinas de leguminosas podrían ser utilizadas también en la formulación de este tipo de productos, como salchichas o análogos de carne (Granito y col., 2007).

Capacidad de retención de agua → es la habilidad del material húmedo para retener agua cuando el material ha sido sometido a fuerzas centrífugas externas o de compresión; por tanto, es la suma del agua enlazada, agua hidrodinámica y agua atrapada físicamente, siendo esta última la que mayor contribución aporta a esta capacidad. Las proteínas son las principales responsables de los incrementos o reducciones que experimenta la capacidad retención de agua en alimentos (Hulton y Campbell, 1981). Por lo tanto, dicha capacidad va a influir en la textura de productos cárnicos, como salchichas o análogos de carne, donde las proteínas son capaces de retener agua sin disolverse, debido a la insuficiente cantidad de agua, proporcionando propiedades de consistencia, adhesión y viscosidad. Asimismo, el empleo de harinas de soja como ingrediente en la elaboración de galletas va a conferir una mejora en el contenido de humedad y una suavidad de la textura debido a las características de retención de agua que proporciona esta legumbre (Aguilera, 2009).

Capacidad de retención de aceite → básicamente el mecanismo de esta propiedad se debe a la retención física del aceite por atracción capilar (Kinsella, 1976). La capacidad de retención de aceite es deseable para la elaboración de carne picada, para la conservación de aromas, para conseguir una mejora de la palatabilidad y para incrementar la vida media de productos de repostería, donuts, panqueques, bollería, así como productos cárnicos, y sopas (Chel-Guerrero y col., 2002). Además, el carácter hidrofóbico de las proteínas también juega un papel importante en la absorción de grasa (Voutsinas y Nakai, 1983). Dzudie y Hardy (1996) sugieren que las harinas preparadas con judías podrían ser utilizadas como ingredientes en la preparación de salchichas.

Densidad aparente → es la propiedad tecno-funcional que relaciona la masa con el volumen ocupado por la harina, incluyendo el volumen de las partículas y los espacios disponibles entre las mismas.

Capacidad de hinchamiento → la fracción amilácea, específicamente la amilopectina, está íntimamente relacionada con esta propiedad, la cual se define como la relación entre el peso húmedo del gel sedimentado y su peso en seco. Los patrones de viscosidad del almidón son establecidos a partir de la capacidad de hinchamiento de los gránulos de almidón y de la resistencia de los gránulos hinchados a ser disueltos mediante calor o fragmentados debido a fuerzas de cizalla. Generalmente, el almidón de las legumbres es más viscoso que otros pertenecientes a cereales, lo que indica que este almidón presenta una mayor resistencia al hinchamiento y a la ruptura. La capacidad de hinchamiento también podría ser atribuida a las uniones del agua con las proteínas solubles. Esta propiedad es muy importante en la elaboración de fideos chinos

transparentes a partir de almidones de leguminosas, los cuales están empezando a ser muy populares en Oriente (Singh y col., 1989).

Capacidad de gelificación → representa la mínima concentración a la que una harina alcanza la máxima gelificación. La capacidad de gelificación de las legumbres parece ser función de la naturaleza y tipo de almidón y proteína que constituyen el alimento, incluyendo posibles complejos proteína-polisacárido que pueden llegar a formar (Tolstoguzov, 1986). Asimismo, la concentración mínima requerida para la formación de un gel en harinas está influenciada por una competición física por el agua entre la gelificación de la proteína y la gelatinización del almidón. Turgeon y Beaulieu (2001) han demostrado la mejora en la textura del gel de proteína con la adición de carbohidratos debido a la disminución de la afinidad termodinámica de las proteínas por la solución acuosa, lo que aumenta la interacción entre proteínas. La capacidad que tienen las harinas de leguminosas para formar geles es muy apropiada en la elaboración de alimentos viscosos tales como salsas procedentes de carnes asadas, sopas, productos de repostería (Padmashree y col., 1987). Además la gelificación específica de la proteína es muy importante en la preparación de pudín, mermeladas y salsas que requieran cuerpo y una textura tipo gel.

Capacidad espumante → es otra propiedad importante en la elaboración de alimentos a partir de harinas de leguminosas. La capacidad de formar espumas en las harinas de legumbres es una característica deseable para la producción de algunos alimentos tradicionales, tales como los productos de repostería (Singh, 2001). La propiedad espumante hace referencia a la capacidad que tienen las proteínas de formar capas estables rodeando las gotitas de gas en una fase líquida (Rangel y col., 2003). Las proteínas con una buena capacidad de formar espumas deberían ser solubles en la fase acuosa, difundir y concentrarse en la fase aire-agua, extenderse parcialmente para formar capas cohesivas alrededor de las burbujas de gas y poseer una viscosidad y fuerza mecánica suficiente para prevenir la ruptura y coalescencia de las gotas (Kinsella, 1979). Asimismo, Diwakar y col. (1996) afirman que esta propiedad depende exclusivamente de la configuración de las moléculas de proteína. En este sentido varios autores han sugerido una relación directa entre la capacidad espumante y la solubilidad del nitrógeno de las harinas de leguminosas (Narahana y Narasinga-Rao, 1982).

Capacidad emulsionante → esta propiedad mide la capacidad de las proteínas para formar una dispersión de una fase oleosa en un medio acuoso (Dagorn-Scaviner y col., 1987). Las características de emulsión de las proteínas contribuyen en gran medida a la funcionabilidad de los alimentos. Son varios los factores que afectan a la capacidad emulsionante, tales como pH, tamaño de gota, carga neta, tensión interfacial, viscosidad y la conformación de la proteína. Se ha observado que los elevados valores

de capacidad emulsionante que poseen algunas proteínas de leguminosas pueden ser debidas a la naturaleza globular que presentan (Sathe y col., 1982) o bien estar directamente relacionadas con la mayor o menor solubilidad que muestran en el alimento (Chau y col., 1998). Asimismo, se atribuye no sólo a las proteínas la capacidad de formar emulsiones, sino que otros componentes de naturaleza no proteica como los carbohidratos también contribuyen sustancialmente a las propiedades de emulsión, como es el caso de las fracciones de fibra alimentaria que se encuentran presentes en el alimento (Betancur-Ancona y col., 2004). Por lo tanto, las harinas procedentes de leguminosas que posean una buena capacidad de formar emulsiones podrán ser utilizadas en la fabricación de alimentos tales como mahonesa, salchichas y aderezos.

III.4 PROCESAMIENTOS DE LAS SEMILLAS DE LEGUMINOSAS

Los diferentes tipos de procesamiento ocasionan efectos muy variables sobre la fibra presente en las legumbres. Este tipo de estudios resulta interesante, ya que la mayor parte de la fibra que consumimos es procesada, modificando no sólo el contenido y la composición, sino también las propiedades sensoriales, tecnofuncionales y nutricionales de la fibra alimentaria.

Los efectos ocasionados en las fracciones de fibra, dependen tanto de la fuente de fibra como del tipo de procesamiento. Diversos estudios sobre los efectos del procesamiento en fibra alimentaria de cereales y verduras, indican que la estructura de la misma se modifica (Chang y Morris, 1990) y, por tanto sus efectos fisiológicos cambian.

III.4.1 INFLUENCIA DEL PROCESAMIENTO TÉRMICO SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LAS LEGUMINOSAS

El conocimiento de los cambios que se producen en la pared celular como consecuencia del tratamiento de cocción y procesamiento de los alimentos, es fundamental para conocer las modificaciones de la fibra y su papel en la dieta (Selvendran y Robertson, 1994). El tratamiento térmico, como la cocción, hace que sea posible el consumo de muchas semillas de leguminosas.

Influencia de la cocción en la Fracción Proteica

Los procesados térmicos de las legumbres no solamente provocan modificaciones en la composición química, nutricional y en las propiedades organolépticas sino que también conllevan pérdidas y transformaciones en los aminoácidos esenciales (Wu, 1995). Una vez que las proteínas han sido desnaturalizadas como consecuencia de la aplicación de calor, van a ver afectadas las propiedades tecnofuncionales, las cuales están directamente relacionadas con las características físico-químicas, principalmente la

disociación de las proteínas en sus subunidades, dando lugar a una mayor exposición de los grupos hidrofóbicos (Aguilera, 2009).

Variaciones extremas en las condiciones de la desnaturalización proteica (pH, fuerzas iónicas, presencia de grupos sulfhidrilo o disulfuro, temperatura, tiempo de aplicación de calor y tasa de enfriamiento) pueden afectar significativamente a la funcionalidad de la proteína y como consecuencia a su función tecnológica en el alimento. La desnaturalización térmica está normalmente acompañada de una reducción de la solubilidad, debido probablemente a la agregación de moléculas no desplegadas. Como consecuencia de todos estos cambios, varias propiedades tecnofuncionales se verán alteradas, como la capacidad de gelificación, las propiedades reológicas de los geles, las capacidades espumantes y emulsificantes, propiedades éstas que están íntimamente relacionadas con las proteínas (Yamagishi y col., 1980; Lawabuchi y col., 1991).

Influencia de la cocción en la Digestibilidad del Almidón

El procesamiento térmico puede influir de manera importante en la fracción de carbohidratos, especialmente en lo que se refiere a la velocidad de digestión del almidón en el intestino delgado. El procesamiento de los alimentos afecta a la estructura del almidón pudiendo provocar la gelatinización parcial o total, así como una parcial retrogradación. La aplicación de calor en presencia de agua produce la gelatinización del almidón, lo que conlleva una pérdida irreversible de la estructura cristalina de los gránulos, una pérdida total de la birrefringencia, un incremento en el tamaño de los gránulos (probablemente no uniforme), un aumento de la viscosidad, etc... (Ring y col., 1988). Este proceso incrementa de forma espectacular la disponibilidad del almidón para ser atacado por las enzimas digestivas (Aguilera, 2009).

El almidón gelatinizado no es estable, porque al pasar el tiempo o enfriarse ocurre un proceso de reasociación de los gránulos de almidón, conocido como retrogradación. La tendencia hacia la retrogradación del almidón depende de las proporciones relativas de amilosa y amilopectina (la amilosa se reasocia más rápidamente). El recalentamiento de los alimentos con almidón también influye en este proceso. El grado de procesamiento de un alimento y la retrogradación del almidón, pueden reducir la digestibilidad del almidón en el intestino delgado. El almidón retrogradado también se suma a la proporción de almidón resistente en los alimentos, por ejemplo, en las patatas cocidas y enfriadas (6,8 y 13,3 g almidón resistente/100g almidón total, respectivamente) (Aguilera, 2009).

Durante la cocción y otros procesos que emplean calentamiento, los gránulos de almidón no están completamente disueltos, aunque el grado de gelatinización que

normalmente se alcanza es suficiente para permitir que se digiera rápidamente una gran proporción de almidón. Cuando este proceso queda incompleto, como en la cocción al vapor, permanece una gran proporción de almidón que se digiere lentamente.

Factores intrínsecos → El tamaño de partícula del alimento puede afectar a la digestión del almidón por parte de las amilasas debido al área superficial. Así, partículas más pequeñas con mayor superficie relativa son digeridas más rápidamente que partículas mayores (Franco y Ciacco, 1992). Otro factor que también afecta a la digestibilidad es la cristalinidad del almidón. En el caso de las leguminosas, el almidón se caracteriza por ser más resistente a la digestión.

Factores extrínsecos → un ejemplo de ello es el grado de masticación que determina el acceso físico al almidón que se encuentra en una estructura rígida. Existen otros factores como el tiempo de tránsito, la forma del alimento, la concentración de amilasa en el intestino, la cantidad de almidón y la presencia de otros componentes en el alimento que podrían afectar a la hidrólisis enzimática del almidón (Aguilera, 2009).

Otros estudios (Edwards, 1995) han revelado que la digestibilidad del almidón depende en cierta parte de la fibra alimentaria que esté asociada, la cual provoca una disminución del tiempo de tránsito intestinal y por lo tanto, reduce el tiempo disponible para la digestión del almidón en el intestino delgado.

Influencia de la cocción en la Fibra alimentaria

La gran variedad de plantas, así como de órganos y tejidos de las mismas, que se utilizan como alimentos, hace difícil poder generalizar sobre los efectos del cocinado y procesamiento en la fibra alimentaria (Selvendran y Robertson, 1994). Sin embargo, se puede generalizar las principales consecuencias del cocinado en la fibra alimentaria. La primera de ellas es la ruptura de la membrana celular con la liberación de los contenidos celulares, que afecta marcadamente el entorno de la pared celular y modifica la estabilidad de los polisacáridos que la constituyen. La segunda se caracteriza por modificaciones de los polisacáridos de la pared celular, como resultado de los tratamientos con calor y de la ruptura de los polisacáridos térmicamente lábiles, tales como los polisacáridos pécticos, y de los enlaces cruzados (Aguilera, 2009) que se degradan durante el cocinado, particularmente los polisacáridos pécticos situados en el cotiledón de las semillas de leguminosas.

El procesamiento térmico afecta el contenido de fibra alimentaria en diferentes tipos de leguminosas (Vidal-Valverde y Frías, 1991; Gooneratne y col., 1994; Nyman y col., 1994; Periago y col., 1996). En general, los cambios en la composición de la fibra alimentaria durante la cocción pueden ser en parte atribuidos a una redistribución de los

componentes solubles y insolubles de los polisacáridos no amiláceos y en parte debido a la formación de almidón resistente (Theed y Phillips, 1995; Periago y col., 1996).

La ruptura de enlaces glucosídicos de los polisacáridos de la fibra por el calor, da lugar a una solubilización de fibra inicialmente insoluble. Asimismo, las fibras solubles de alto peso molecular pueden ser degradadas a fragmentos más pequeños, o puede ocurrir una despolimeración más importante y esta fracción no precipitará en etanol, por lo que no será cuantificada como fibra (Chang y Morris, 1990). Además de la solubilización, los tratamientos con calor pueden ocasionar un aumento del contenido de fibra, como consecuencia de la formación de algunos compuestos como almidón resistente y productos de la reacción de Maillard (Marlett y Vollendorf, 1993).

En algunos estudios, se observa un incremento en la fibra alimentaria soluble en muestras cocidas comparadas con muestras crudas, en leguminosas como guisantes y judías (Kutos y col., 2003; Almeida Costa y col., 2006). Sin embargo, otros estudios sugieren una reducción de fibra soluble con la cocción (Vidal-Valverde y Frias, 1991).

Según algunos autores, la cocción provoca un incremento en fibra insoluble en leguminosas y una reducción en el contenido de almidón resistente (Kutos y col., 2003, Almeida Costa y col., 2006,). No obstante, otros trabajos demuestran que la cocción induce a un incremento en los valores de almidón resistente, principalmente debido a retrogradación del almidón (Tovar y col., 1990; Tovar y Melito, 1996; Cheung y Chau, 1998; Ratnayake y col., 2001; Tharanathan y Mahadevamma, 2003; Stojceska y col., 2010).

Influencia de la cocción en las Propiedades Tecnofuncionales

Existen distintos procesamiento que alteran en mayor o menor medida las propiedades tecno-funcionales provocando cambios físicos, químicos y estructurales en la composición de las harinas de leguminosas. La textura es uno de los atributos de calidad más importantes en semillas de leguminosas, porque afecta la palatabilidad y en consecuencia la aceptabilidad de los consumidores. Entre ellas el grado de solubilidad de polisacáridos y la despolimerización durante el proceso de cocción resulta ser un factor determinante en la calidad textural (Shiga y col., 2003).

Una de las fracciones que se ve afectada en mayor medida por el proceso térmico es la fracción amilácea. Los cambios observados en el almidón se reflejan en las propiedades de absorción de agua, densidad aparente, hinchamiento y gelificación. La absorción de agua durante la cocción depende principalmente de los gránulos de almidón, los cuales están unidos por puentes de hidrógeno en forma de paquetes cristalinos, llamados micelas (Dzudie y Hardy, 1996). Cuando las suspensiones de los gránulos de almidón son

calentados, estas estructuras se hidratan y provocan un aumento de la absorción de agua por parte de las harinas de leguminosas (Aguilera, 2009).

Respecto a la densidad aparente se trata de una propiedad sensible a tratamientos tecnológicos como es el tratamiento térmico, fermentación o germinación, debido probablemente a las modificaciones estructurales que experimentan los gránulos de almidón durante el procesado. Se ha observado en muchos casos que la cocción de las harinas da lugar a una mayor densidad de estructura como consecuencia de la parcial o completa gelatinización de los gránulos de almidón (Njintang y col., 2006).

La capacidad de hinchamiento también es otra propiedad tecno-funcional que se va a ver afectada por el tratamiento térmico, experimentando grandes incrementos debido a la gelatinización del almidón, lo que provoca un mayor aumento de peso del residuo cuando es expuesto a una fase acuosa. Además se ha observado que la capacidad de hinchamiento aumenta linealmente con el calor de gelatinización y desciende linealmente con el contenido de amilosa (Sasaki y Matsuki, 1998).

Cabe destacar que las proteínas, cuando son sometidos a distintos procesos térmicos dan lugar a modificaciones en ciertas propiedades tecnofuncionales, como son la capacidad de retención de agua y aceite, espumante, de emulsión y gelificación. Estas variaciones son como consecuencia de los cambios en la concentración y en la conformación estructural de las proteínas.

Respecto a la capacidad de gelificación tras un tratamiento térmico, suele experimentar un ligero incremento como consecuencia de los cambios en la estructura de las proteínas y el almidón, logrando un efecto sinérgico (Prinyawiwatkul y col., 1997). Sin embargo, otros autores como Singh (2001) argumentan que la facilidad de las harinas de leguminosas tratadas térmicamente para formar pastas viscosas y geles es debida principalmente al poder de gelificación de las proteínas más que a la gelatinización del almidón.

En lo que refiere a la capacidad espumante, se suelen producir significativas reducciones en dicha capacidad como consecuencia de la aplicación de procesos térmicos (Diwakar y col., 1996). Se ha observado que la solubilidad de las proteínas se ve reducida por el tratamiento térmico debido al proceso de desnaturalización, lo que puede provocar cierta disminución en la capacidad espumante. Singh (2001) mostraba que los cambios en las concentraciones de albúmina y globulina pueden estar relacionados con el descenso en la capacidad espumante como consecuencia del tratamiento térmico.

Por otra parte, la capacidad emulsionante es una propiedad muy sensible al tratamiento térmico, provocando en general marcadas reducciones en las harinas de leguminosas

procesadas (Singh, 2001). La aplicación de calor afecta a la estructura de las proteínas que exhiben numerosas cadenas polares, lo que aporta carácter hidrofílico, afectando por lo tanto a su solubilidad y a las propiedades emulsionantes.

III.4.2 GERMINACIÓN

La germinación de la semilla comprende una serie de procesos que comienzan con la imbibición de agua y culminan con la emergencia de la plántula a través de las cubiertas. La absorción de agua por la semilla desencadena una secuencia de cambios metabólicos, que incluyen la activación del proceso respiratorio, la síntesis proteica y la movilización de las reservas. A su vez la división y alargamiento celular en el embrión produce la rotura de las cubiertas de las semillas, que generalmente es ocasionada por la emergencia de la radícula (Figura III.21).

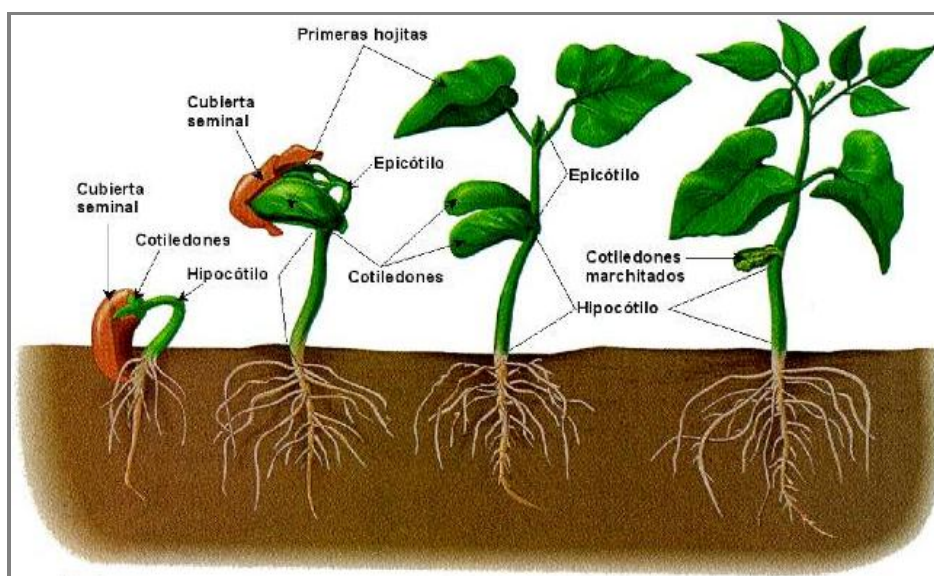


Figura III.21 - Germinación de *Phaseolus* sp.

Fase de imbibición

El primer proceso que tiene lugar durante la germinación es la toma de agua por la semilla: fase de imbibición. La magnitud de esta fase está determinada por tres factores: composición química de la semilla, permeabilidad de la envuelta seminal y disponibilidad de agua en el medio. La fase de absorción de agua provoca alteraciones temporales en la permeabilidad diferencial de las membranas de la semilla y, por consiguiente, una pérdida al medio circundante de solutos y diferentes metabolitos de bajo peso molecular (azúcares, ácidos orgánicos, iones, aminoácidos, péptidos, etc). Esa

transición puede ser retrasada o inhibida por la presencia de azúcares o proteínas (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

Las semillas que almacenan almidón en sus cotiledones, como en el caso de las leguminosas, son capaces de reparar y activar las mitocondrias existentes en la semilla seca. Así pues, durante los primeros instantes de la imbibición la respiración de la semilla es fundamentalmente anaerobia, y se transforma en aerobia a medida que la radícula o el eje embrionario atraviesan los tejidos envolventes y la cubierta seminal (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Por otra parte, todos los componentes están presentes en la semilla seca viable, y a los pocos minutos de comenzar la imbibición, empieza la desaparición de los ribosomas.

La entrada de agua en el interior de la semilla se debe exclusivamente a una diferencia de potencial hídrico. La entrada de agua en la semilla rehidrata las reservas alimenticias, que sólo pueden transformarse en sustancias disponibles al embrión en presencia de agua, como también, los sistemas enzimáticos responsables de la hidrólisis de las sustancias de reserva sólo se activan en presencia de agua.

La absorción de agua por parte de la semilla se divide en tres fases:

Fase 1 → rápida e inmediata salida de solutos y metabolitos de bajo peso molecular al medio

Fase 2 → principales procesos metabólicos que conducen a la emergencia de la radícula

Fase 3 → la elongación de la radícula

Uno de los primeros cambios que se observan durante la imbibición es la reanudación de la actividad respiratoria. En este sentido se observan tres rutas respiratorias, glucólisis, ciclo de las pentosas fosfato y ciclo del ácido cítrico son funcionales en las semillas imbibidas. Estas tres rutas producirán una serie de compuestos intermediarios del metabolismo vegetal, así como considerables cantidades de energía y poder reductor.

La toma de oxígeno es superior en los primeros días de germinación probablemente debido a la actividad fermentativa observada en muchas semillas en estos primeros momentos de la germinación. Posteriormente se observa la rotura de la testa por parte de la radícula, lo que hace que el intercambio de gases tenga lugar sin la limitación impuesta a veces por la cubierta seminal. Finalmente, se disminuye la respiración y coincidente con la desintegración de los cotiledones, una vez que se han agotado las reservas nutritivas, puede observarse en muchas semillas. Al iniciarse la germinación de las semillas se produce una activación de la síntesis proteica que da lugar, entre otras proteínas, a la formación de enzimas hidrolíticas que producen la movilización de las reservas (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

Movilización de las reservas

Las semillas contienen cantidades relativamente importantes de reservas alimenticias, que mantienen el crecimiento y el desarrollo de la plántula hasta que ésta es capaz de alimentarse por sí misma. Estas reservas se encuentran en su mayor parte, aunque no exclusivamente, formando cuerpos intracelulares que contienen lípidos, proteínas, carbohidratos y compuestos inorgánicos. En las leguminosas, por ejemplo, las reservas están localizados en los cotiledones (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

Aunque se hayan encontrado en semillas diversos polisacáridos como material de reserva, sólo el almidón ha sido extensamente estudiado en su metabolismo durante la germinación, debido a estar presente en casi todas la semillas y constituir en la mayoría de ellas la principal reserva de energía. El almidón se encuentra formando corpúsculos intracelulares denominados granos de almidón. Dichos gránulos muestran una apariencia característica en cada especie.

En las semillas de la mayoría de las leguminosas que acumulan almidón en los cotiledones se produce un descenso en el contenido de este compuesto durante la germinación. En algunos casos, se aprecia también una acumulación de azúcares solubles en los primeros días de germinación que tiende a disminuir posteriormente. En otros casos no se detecta ningún aumento en la concentración de azúcares solubles en los cotiledones, lo que indica que se produce una rápida movilización de los productos hacia la plántula en desarrollo. La reducción en el contenido de almidón en los cotiledones viene acompañada, generalmente, por un aumento de la actividades α -amilasa (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

Dos rutas catabólicas participan en la degradación del almidón. Una de ellas es hidrolítica e implica la acción de las α y β -amilasas. Actualmente se sabe que la α -amilasa es la única enzima capaz de atacar al gránulo de almidón nativo. La tasa de desaparición del almidón se incrementa durante la germinación. Durante los primeros días el almidón es atacado lentamente, posteriormente la degradación es rápida, y desemboca en la práctica desaparición del polisacárido, como ocurre en guisante, aunque también se dan casos como en lenteja en los que al cabo de trece días aún queda el 50% del almidón sin degradar (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

La movilización del almidón en los cotiledones de leguminosas se inicia después de que la radícula ha comenzado su elongación. La primera enzima que aumenta su actividad en los cotiledones es la fosforilasa, seguida algunos días después por un aumento en las amilasas. Parece, por tanto, que la degradación inicial lenta del almidón en leguminosas es consecuencia de la actividad fosforolítica. El papel de la fosforilasa durante estos

primeros momentos de la germinación podría ser también el de suministrar el sustrato para la glucólisis (glucosa 1-P) sin necesidad de consumir ATP.

La degradación de las proteínas de reserva se logra por la acción más o menos específica de enzimas proteolíticas cuya importancia es vital para el desarrollo de la nueva plántula. En las dicotiledóneas la degradación de las proteínas de reserva ha sido estudiada intensamente utilizando semillas de *Phaseolus vulgaris* y *Lens culinaris*. Durante la germinación de semillas de algunas leguminosas hay una degradación de las proteínas de reserva que se corresponde con una acumulación de aminoácidos libres en los cotiledones. La digestión de los cuerpos proteicos comienza en la periferia y avanza progresivamente hacia el centro de los cotiledones. El máximo de actividad proteolítica se produce a los cinco días de germinación, que coincide con el máximo de acumulación de aminoácidos libres (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

Fin de la germinación

La emergencia radicular marca el fin de la germinación y el comienzo del crecimiento de la plántula. La señal que induce el inicio de la elongación y el mecanismo íntimo de ésta no se conoce; sin embargo, existen tres posibilidades:

- o acumulación de solutos osmóticos para provocar el incremento de la presión de turgencia
- o aumento en la extensibilidad de las paredes celulares, previo al inicio de la elongación
- o acción conjunta de los procesos de elongación de la radícula y relajación de los tejidos que la rodean (hidrólisis de los componentes polisacáridos de la pared celular)

Influencia de la germinación en los componentes de harinas de leguminosas

Cada vez está más extendido el proceso de germinación aplicado a las semillas de leguminosas, como proceso natural para obtener alimentos saludables, que son bien asimilados por el organismo al tener gran contenido en agua, vitaminas y minerales. Entre los más apreciados se encuentran las semillas germinadas de soja, y últimamente se están introduciendo otras variedades como lentejas y judías. La germinación de semillas de leguminosas es realizada extensivamente en muchos países, principalmente donde la producción de las legumbres tiene mayor demanda por los consumidores.

Actualmente, el comercio está usando la germinación de semillas para la producción de nuevos alimentos, donde es muy importante conocer el número de semillas capaces de germinar (Berrios y col., 1999). Para que las semillas permanezcan viables y vigorosas es imprescindible la integridad de sus células (Priestley, 1986); para esto se estudian las condiciones ideales para mantener la integridad de las estructuras celulares

(temperatura, porcentaje de humedad, y capacidad de almacenamiento) relacionadas con la germinación que varían según la especie vegetal, variedad.

El proceso de germinación generalmente mejora la calidad nutricional de las legumbres, no sólo por la reducción de los componentes antinutritivos, sino también por el aumento de los niveles de aminoácidos libres, carbohidratos aprovechables, fibra alimentaria y otros componentes (Urbano y col., 2005; Zielinski y col., 2006; Martínez-Villaluenga y col., 2006), y aumenta la funcionalidad de las semillas debido al aumento de determinados compuestos bioactivos (Fernández-Orozco y col., 2003; Fernández-Orozco y col., 2006).

Durante este proceso, el almidón va siendo modificado y transformado, lo cual responde a que en un momento determinado de la germinación aumentará el almidón digerible (Mahadevamma y Tharanathan, 2004; Ghavidel y Prakash, 2007). Por lo tanto, con los resultados obtenidos, podemos deducir que la germinación mejora la disponibilidad del almidón, de manera que si se requiere como fuente de energía, el proceso de germinación puede ser un buen método para obtenerla. El aumento de la actividad α -amilasa probablemente reduce el contenido de almidón resistente de la pared celular, resultado de los cambios fisiológicos en el desarrollo del brote.

En este sentido, se ha podido observar en semillas de guisantes que el proceso de germinación tiende a modificar la estructura de los polisacáridos, afectando posiblemente a la integridad de los tejidos y provocando la ruptura de las asociaciones proteínas-carbohidratos. Esto implicaría una considerable síntesis de pared celular y, por tanto, un aumento y modificación de la fibra alimentaria y en consecuencia, de sus propiedades físico-químicas y efectos fisiológicos (Martín-Cabrejas y col., 2008). Esto sugiere la síntesis de polisacáridos, además de la síntesis de nuevas proteínas y RNA mensajero durante la germinación (Abdel-Rehim y col., 1995; Mohamed-Abdel y col., 1995). Los incrementos observados en el contenido de fibra alimentaria de semillas germinadas pueden ser debidos a una mayor solubilización de sustancias pécticas, que presentan una estructura ramificada y son más susceptibles de sufrir una ruptura durante este proceso (Pérez- Hidalgo y col., 1997; Almeida Costa y col., 2006). Por tanto, los polisacáridos son movilizados durante la germinación, proporcionando a la planta cantidades de carbohidratos solubles que pueden ser utilizados para la formación de otros componentes celulares y para la respiración produciendo energía (Brett y Waldron, 1996).

Durante la germinación puede observarse la síntesis de polisacáridos, además de la síntesis de nuevas proteínas y RNA mensajero (Abdel-Rehim y col., 1995; Mohamed-Abdel y col., 1995). Los polisacáridos son movilizados durante la germinación, proporcionando a la planta cantidades de carbohidratos solubles que pueden ser utilizados para la

formación de otros componentes celulares y para la respiración produciendo energía (Brett y Waldron, 1996).

La germinación puede provocar aumento en los niveles de grasa en harinas de leguminosas, debido a la actividad fotosintética que ejercen los cotiledones del producto germinado (Osman, 2007).

La germinación de semillas de leguminosas modifica su composición fenólica, de forma diferente dependiendo del tipo de leguminosa que se trate. En compuestos de tipo flavonoideo se han observado cambios más importantes, destacando la formación, en judías, de glicósidos de flavonoles (López-Amorós y col., 1998) y la disminución de proantocianidinas en lentejas (Bartolomé y col., 1997; López-Amorós, 2000; López-Amorós y col., 2006). En lentejas también se observa un aumento de los compuestos hidroxicinámicos) y una cierta disminución de los hidroxibenzoicos (Bartolomé y col., 1997, López-Amorós, 2000; López-Amorós y col., 2006). Los cambios metabólicos observados están afectados por las condiciones de germinación, como luz y días de germinación (López-Amorós y col., 2006). De esta forma, estos autores observaron que la actividad antioxidante se reduce en el sexto día de germinación.

La gran variación en cuanto al comportamiento de los componentes fenólicos podría ser explicada por el complejo metabolismo bioquímico de las semillas durante el proceso germinativo (Dueñas y col., 2009). Las enzimas endógenas de las leguminosas se activan durante la germinación provocando diferencias en las variaciones de la composición química de judía y lenteja. Dichas enzimas, como las hidrolasas y polifenoloxidasas, están directamente relacionadas con los compuestos fenólicos ya que su actividad aumenta durante la germinación, aunque de una manera diferente, dependiendo del tipo de leguminosa (Rao y Deosthale, 1987).

La concentración en estos compuestos bioactivos que se producen como consecuencia de la germinación, se traducen en la modificación de su capacidad antioxidante, pudiéndose valorar de esta forma los posibles efectos biológicos de las leguminosas germinadas (López-Amorós y col., 2001). No obstante, en la literatura se encuentran artículos que describen una tendencia al incremento de la actividad antioxidante cuanto más tiempo permanece la muestra germinada (Lin y Lai, 2006; Fernandez-Orozco y col., 2008, Dueñas y col., 2009).

Por otra parte, la germinación ejerce una gran influencia en el contenido de vitaminas, ya que estimula la biosíntesis de determinadas vitaminas hidrosolubles, dando lugar en algunos casos a la aparición de vitamina C en lentejas (Frías y col., 2002), y también riboflavina, tiamina y niacina, incrementando también los niveles de aminoácidos libres (Urbano y col., 1995).

*"Una comida bien equilibrada
es como una especie de poema al desarrollo de la vida."*

Anthony Burgess

Capítulo 1 - ESTUDIO INICIAL DE CARACTERIZACIÓN DE LEGUMINOSAS

1



Pietra Sarmento Fritsche

Capítulo 1 - ESTUDIO INICIAL DE CARACTERIZACIÓN DE LEGUMINOSAS

1.1 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

La caracterización físico-química de las leguminosas objeto de estudio proporciona, desde una perspectiva alimentaria, un análisis básico del producto, que es indispensable para la justificación de los posibles cambios producidos por los diferentes tratamientos, cocción y germinación, a los que se van a someter dichas leguminosas.

Por tanto, es preciso realizar un estudio inicial de caracterización de las leguminosas para poder evaluar posteriormente el efecto de su procesamiento sobre sus componentes nutritivos. Estos compuestos se ven afectados tanto por factores intrínsecos (el origen y la variedad de un alimento), como por factores extrínsecos (diferentes tipos de procesado, condiciones del almacenamiento, entre otros).

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar morfológicamente dos especies de leguminosas: judía de Tolosa y lenteja de La Armuña.
- Determinar los efectos de la cocción y germinación en las características físicas y composición química básica de las leguminosas objeto de estudio.

1.3 METODOLOGÍA

MUESTRAS

Las leguminosas elegidas para este estudio son: judía (*Phaseolus vulgaris* L. subespecie *volubilis*) variedad de Tolosa de la región de Guipúzcoa, y lenteja (*Lens culinaris* Medicus) de la región de La Armuña y de la variedad "Rubia de la Armuña". Estas variedades de leguminosas tienen relevante interés en la agricultura y en la dieta mediterránea, como se ha expuesto antes en el apartado de Antecedentes de la presente Tesis.

PROCESAMIENTOS

Cocción

Las legumbres (500 g de semillas) se dejan en remojo durante 18 horas y posteriormente se cuecen en olla casera, durante 1 hora en el caso de la judía y 20 minutos la lenteja.

Germinación

La germinación se llevó a cabo en el Instituto de Fermentaciones Industriales del CSIC. Previamente se someten las semillas a un remojo con hipoclorito sódico durante 30 minutos, y después se lavan hasta alcanzar pH neutro. La germinación se realiza en un germinador (G-120 Snijders International S.L., Holland), a 20 °C, en oscuridad, 99% de humedad, durante 7 días.

Preparación de las harinas

Finalmente, las semillas sometidas a ambos procesos se congelan en nitrógeno líquido, se liofilizan durante 72 horas y, posteriormente, se muelen y tamizan (0,5 mm de luz de malla). Las harinas se almacenan en refrigeración (4 °C) para su posterior análisis.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y FÍSICAS

Las características morfológicas de judía de Tolosa y de lenteja de La Armuña se determinan por medio de la elección al azar de 25 semillas y mediante un calibre se mide su longitud, anchura y grosor (Giami y Okwechime, 1993). El aspecto de las legumbres también es observado, tomándose 100 unidades al azar y clasificándose en función de su aspecto físico y su color (negro brillante, tostado, pardo, crema).

En la determinación de las características físicas se estudia el peso, volumen y densidad de las semillas. Para medir el peso se eligen al azar 100 unidades, se pesan en conjunto y los resultados son expresados en gramos por 100 unidades (Giami y Okwechime, 1993). El volumen se calcula utilizando una probeta graduada que contiene un volumen determinado de agua (50, 100 ó 500 ml), se introducen 100 semillas, previamente pesadas, y se observa el desplazamiento del agua (Figura 1.1), que corresponde al volumen de las legumbres, expresándose el resultado en ml/100 unidades (Phirke y col., 1982; Giami y Okwechime, 1993).

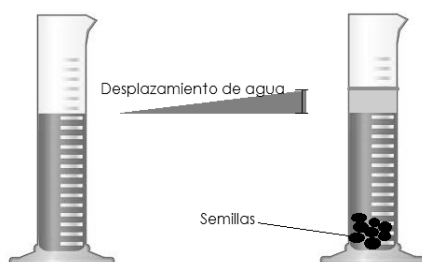


Figura 1.1 – Determinación del volumen por desplazamiento de agua.

Se calcula la densidad de las semillas a partir de los resultados de peso y volumen, expresándose en g/ml (Pirke y col., 1982; Giami y Okwechime, 1993).

COMPOSICIÓN QUÍMICA

Se analiza la composición química básica de las harinas de judía y lenteja tanto crudas como procesadas, según métodos oficiales de la AOAC (1995), que comprende la determinación de:

- humedad - se determina mediante diferencia de peso de la harina antes y después del secado en estufa a 65 °C, hasta que la muestra alcance peso constante (método 934.01; AOAC, 1995). Para esto se pesan 0,5 g \pm 0,0001 g de cada una de las harinas de leguminosa, solamente en las muestras crudas de judía y lenteja, ya que las muestras procesadas se encontraban liofilizadas.
- cenizas - se determina por mineralización de las muestras (1,0 g \pm 0,0001 g) a una temperatura de 525 °C en un horno tipo mufla durante 4 horas (método 942.05; AOAC, 1995) (Figura 1.2), midiendo el peso de la muestra antes y después de la mineralización.

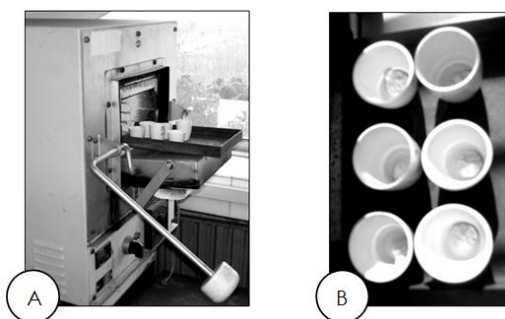


Figura 1.2 – (A) Horno mufla con crisoles. (B) Crisoles con muestra de cenizas.

- grasa - se extrae mediante sistema Soxhlet (método 948.22; AOAC, 1995). La determinación cuantitativa del contenido graso de un alimento se realiza, por lo general, por extracción con un disolvente orgánico; en el presente trabajo se utiliza éter de petróleo. Se parte de 2,5 g de muestra y 250 ml de éter de petróleo, manteniéndose durante 6 horas en baño de agua a 60 °C, a una velocidad de condensación de 3-6 gotas/segundo.

Seguidamente, los matraces son introducidos en el rotavapor para extraer el exceso de éter de petróleo. Posteriormente, se secan en la estufa a 105 °C, durante 24 horas

para eliminar por completo todo el disolvente. Se dejan enfriar en el desecador y se pesa el matraz con la grasa.

- proteína total o bruta - se determina usando un bloque digestor Kjeldahl (método 32.1.22; AOAC, 1995) en la placa calefactora con arrastre de gases (Figura 1.3), y se aumenta la temperatura de forma progresiva hasta ebullición (350 °C durante 2 horas). Se calcula la proteína bruta o total a partir de los datos obtenidos de nitrógeno multiplicando por el factor 6,25. La cuantificación del nitrógeno se llevó a cabo mediante espectrofotometría colorimétrica. La reacción es una modificación del método de Berthelot (1959) que consiste en fijar el átomo de nitrógeno con dos moléculas de fenol bajo la acción oxidante del hipoclorito de sodio obteniendo una disolución de color azul debido a la presencia de indofenol.

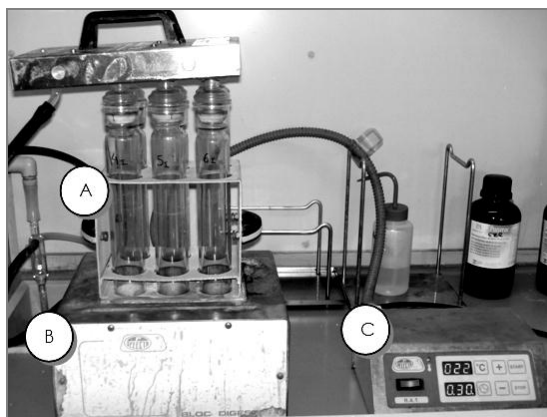


Figura 1.3 – Sistema Kjeldahl: (A) Bloque digestor; (B) placa calefactora; (C) controlador de temperatura y tiempo.

La estimación de la cantidad de proteínas se realiza a partir del nitrógeno que contiene la muestra, que es una cuantificación de forma indirecta y aproximada. El método Kjeldahl determina la totalidad del nitrógeno que está en forma proteica, aunque según la naturaleza del producto, una fracción del nitrógeno también procede de otros compuestos nitrogenados (bases púricas y pirimídicas, creatinas y creatinina, urea, amoníaco, etc.) (Adrian y col., 2000).

- carbohidratos totales (CT) - se determinan por diferencia con el porcentaje de cenizas, grasa y proteínas:

$$CT (\%) = 100 - \% \text{ cenizas} - \% \text{ grasa} - \% \text{ proteínas}$$

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos experimentalmente se realizaron cálculos de estadística descriptiva (media aritmética y desviación típica), un análisis de varianza de un factor (ANOVA) y la correlación lineal entre distintas variables (Bender y col., 1989). Las medias procedentes de los tratamientos se han comparado usando el test de Duncan, para más de dos grupos, la probabilidad fue $P < 0,05$. De esta forma se busca conocer si hay diferencia significativa entre los distintos tratamientos empleados en las leguminosas, siendo expresados en forma de grupos de letras, donde las letras indican diferencias significativas.

Para los casos en que hay necesidad de verificar si existen relaciones entre distintas variables, se utiliza el análisis de correlaciones que es un índice que mide el grado de covariación entre distintas variables relacionadas linealmente. Las correlaciones son calculadas con el estadístico de Pearson (r). Los valores son considerados significativos para valores de $P < 0,01$.

Otros resultados se mostraran más complejos al intentar interpretarlos, debido a la gran cantidad de datos. Para facilitar el entendimiento de estos resultados se utiliza como herramienta estadística la clasificación con dendrogramas recurriendo a una vinculación de Ward. De esta forma se tiene las siguientes definiciones:

Dendrograma - Representación gráfica de los resultados de un procedimiento jerárquico en el que cada objeto o elemento analizado se figura en un eje, representando en el otro eje los pasos del procedimiento jerárquico. Comenzando con cada objeto representado como un conglomerado separado, el dendrograma muestra gráficamente cómo se combinan los clusters (líneas de unión entre las muestras más similares entre sí) en cada paso del procedimiento hasta que se encuentran todos los contenidos en un cluster aislado.

Combinación de conglomerados utilizando vinculación de Ward - es uno de los más utilizados en la práctica; posee casi todas las ventajas del método de la media y suele ser más discriminativo en la determinación de los niveles de agrupación.

Los análisis estadísticos realizados en los resultados de este trabajo, presentados a lo largo de sus siete capítulos, se realizaron mediante el programa estadístico SPSS 20.0.

1.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y FÍSICAS

En la Figura 1.4 se describen las características morfológicas medias de las legumbres objeto de estudio, indicándose las dimensiones de las semillas crudas.

La judía de la especie *Phaseolus vulgaris* subespecie *volubilis* variedad de Tolosa es del tipo negra redonda, y se caracteriza por presentar color púrpura oscuro, curvado con aspecto redondeado y brillante. La lenteja de la región de La Armuña es de variedad rubia, de aspecto circular, presenta una cubierta de color marrón o pardo con pequeñas manchas negras, pudiendo tener en ocasiones un jaspeado también negro que puede ocupar toda la cubierta.

En cuanto a las dimensiones de las semillas se observa que la judía estudiada (12,9 x 8,4 x 6,9 mm) presenta dimensiones superiores a la judía Pinta (11,0 x 7,5 x 4,5 mm), sin embargo tiene longitud y anchura inferior a la judía variedad Cannellini (15,5 x 8,5 x 3,0 mm), de acuerdo con los resultados de Aguilera (2009). Las dimensiones de la lenteja de La Armuña son 6,9 x 6,9 x 2,6 mm, valores superiores a los encontrados para la lenteja variedad Pardina (5,5 x 5,5 x 2,5 cm) (Aguilera, 2009).



Figura 1.4 – Características morfológicas y físicas de semillas de leguminosas crudas.

En la Figura 1.4 también se muestran las principales características físicas de las leguminosas estudiadas. Con relación al peso, se observa que la judía presenta mayor valor (58,7 g/100 unidades) comparado con la lenteja (6,9 g/100 unidades). Estos valores apreciados en judía son superiores a los observados para otras variedades de judía como Cannellini (51 g) y Pinta (47 g) (Aguilera, 2009), y otros tipos de judía común (20 - 50 g/ 100 unidades) (Martín-Cabrejas y col., 1997), mientras que la lenteja de La Armuña presenta valores superiores que la lenteja Pardina (5,4 g) (Aguilera, 2009).

El volumen ocupado por 100 semillas de judía es del orden de 42 ml/100 unidades, muy superior al volumen ocupado por las semillas de lenteja (6 ml/100 unidades). Los resultados para judía son similares a judía variedad Rose Coco (43 ml/100 unidades) (Martín-Cabrejas y col., 1997). En relación a la densidad, se observa que no hay mucha variación entre los resultados de judía (1,4 g/ml) y lenteja (1,6 g/ml), siendo estos valores próximos a los encontrados por Martín-Cabrejas y col. (1997) en diferentes variedades de judía común (1,21 – 1,34 g/ml) y por Aguilera (2009) que estudió diferentes tipos y variedades de legumbres (1,2 - 1,3 g/ml).

COMPOSICIÓN QUÍMICA

Se observa en la Tabla 1.1 la composición química de harinas de leguminosas de muestras crudas y, a diferencia de las determinaciones anteriormente desarrolladas, se han analizado también en muestras procesadas, excepto la determinación de humedad, ya que las harinas de las muestras procesadas se encuentran liofilizadas.

Humedad

En lo que respecta al valor de humedad se observa un mayor contenido en la muestra cruda de judía (8%) que en la lenteja cruda (7%) (Tabla 1.1). Los valores de humedad de las leguminosas del presente trabajo son superiores a variedades de judía común (5%) (Dzudie y Hardy, 1996; Martín-Cabrejas y col., 1997), judía Cannellini (6%) y lenteja Pardina (4%) (Aguilera, 2009), aunque resultan inferiores a otros trabajos con judía común (10%) (Marconi y col., 2000), judía variedad Carioca Eté (10%) y lenteja variedad Silvina (11%) (Almeida Costa y col., 2006), lenteja común (12%) (Ghavidel y Prakash, 2007) y judía Pinta (8%) (Aguilera, 2009).

Tabla 1.1 – Composición química de leguminosas crudas y procesadas.

	Muestra	Humedad (%)	Cenizas ¹	Grasa ¹	Proteína ¹	Carbohidratos ²
Judía	Cruda	7,7 ± 0,0	3,8 ± 0,0 ^b	1,1 ± 0,1 ^a	17,7 ± 0,5 ^b	77,4
	Cocida	-	2,6 ± 0,1 ^a	1,2 ± 0,1 ^a	18,7 ± 0,4 ^c	77,5
	Germinada	-	4,3 ± 0,0 ^c	2,0 ± 0,2 ^b	15,7 ± 0,4 ^a	78,2
Lenteja	Cruda	6,7 ± 0,2	3,4 ± 0,1 ^b	0,8 ± 0,0 ^a	22,0 ± 0,8 ^b	73,8
	Cocida	-	2,1 ± 0,1 ^a	1,4 ± 0,1 ^c	23,7 ± 0,9 ^c	72,9
	Germinada	-	3,6 ± 0,0 ^c	1,1 ± 0,1 ^b	18,9 ± 0,4 ^a	76,4

Los valores son medias ± DE, n=3. Las medias dentro de una columna y leguminosa con diferente superíndice son significativamente diferentes para P<0,05

¹ Expresado en g/100g de materia seca

² Calculado por diferencia de otros componentes (g/100 g ms)

Cenizas

Respecto a los valores de cenizas se observa que entre la muestra cruda de judía (3,8 g/100 g ms) y de lenteja (3,4 g/100 g ms) los resultados son muy próximos (Tabla 1.1 y Figura 1.5). Estos valores coinciden con Almeida Costa y col. (2006) que estudiaron judía común variedad Carioca Eté (3,8 g/100 g ms) y con Aguilera (2009) que encontró un valor del mismo orden en la muestra cruda de lenteja Pardina (3,4 g/100 g ms). Sin embargo, esta misma autora reveló valores superiores en judía Cannellini y judía Pinta (5 g/100 g ms, en ambas), mientras que Chel-Guerrero y col., (2002) encontraron en otros tipos de judía valores de cenizas más bajos, así como Almeida Costa y col. (2006), Iqbal y col. (2006) y Ghavidel y Prakash (2007) en lenteja común (< 3 g/100 g ms). Cuando se compara con otros tipos de leguminosas se observa que el contenido de cenizas en judía cruda es similar al encontrado en garbanzo y guisante (± 4 g/100 g ms) (Iqbal y col., 2006).

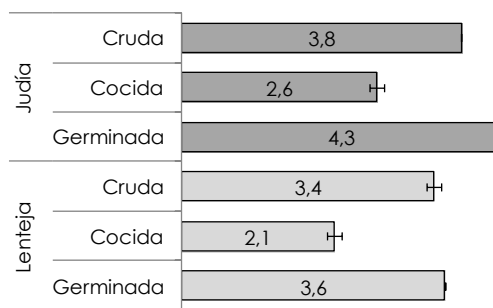


Figura 1.5 – Contenido de cenizas de leguminosas crudas y procesadas (g/100 g ms).

Comparando los resultados de la muestra cruda con las muestras procesadas se observa una reducción en el contenido de cenizas cuando las muestras son sometidas a cocción (Figura 1.5). En la muestra de lenteja cocida esta reducción llega al 40%, mientras que en judía cocida no es superior al 30%, lo que puede deberse a las pérdidas de minerales por lixiviación en las aguas de remojo y cocción. Estas reducciones en los niveles de cenizas también fueron observadas por Aguilera (2009) y Wang y col. (2009 y 2010). Marconi y col. (2000), apreciaron una drástica reducción (70%) en garbanzo común y judía variedad Borlotto cocidos, mientras que Akpapunam y Sefa-Dedeh (1997), Granito y col. (2007) y Shiga y col. (2009) observaron una reducción menos acentuada en diferentes tipos de judía (15%) tras el tratamiento de cocción.

Por el contrario, la germinación incrementa el contenido de cenizas en judía (14%) y en lenteja (4%), probablemente debido a las transformaciones fisiológicas de la semilla. La tendencia en presentar incremento en el contenido de cenizas en muestras germinadas

y reducción en muestras cocidas también fue observada por Akpapunam y Sefa-Dedeh (1997) en muestras de canavalia (*Canavalia ensiformis* L.).

Grasas

En relación al contenido de grasa, los valores encontrados oscilan de 0,8 a 2 g/100 g ms en las leguminosas estudiadas (Tabla 1.1 y Figura 1.6). Entre las muestras crudas, la judía (1,1 g/100 g ms) presenta un valor superior a la lenteja (0,8 g/100 g ms). Estos resultados en judía son similares a los descritos por Dzudie y Hardy (1996), Granito y col. (2007), Osman (2007) y Shiga y col. (2009), mientras que otros autores (Marconi y col., 2000; Almeida Costa y col., 2006) apreciaron niveles superiores de grasa en diferentes tipos y variedades de judía. En la muestra cruda de lenteja el valor es inferior al observado en otras variedades como es el caso de la lenteja Silvina (2 g/100 g ms) (Almeida Costa y col., 2006) y lenteja Pardina (3 g/100 g ms) (Aguilera, 2009).

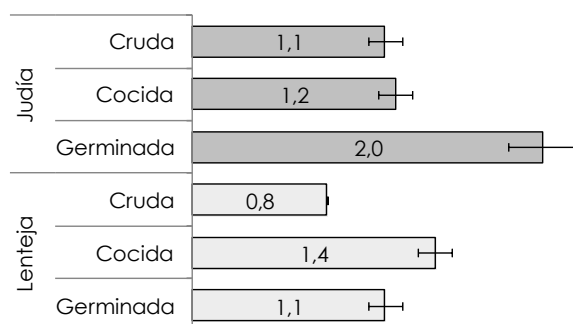


Figura 1.6 – Contenido de grasa de leguminosas crudas y procesadas (g/100 g ms).

La cocción parece afectar de diferentes formas a las leguminosas (Figura 1.6). Contrario al comportamiento observado en judía, donde no hay diferencia significativa entre las muestras, en lenteja se observa un marcado incremento, alcanzando 1,4 g/100 g ms. Almeida Costa y col. (2006) también observaron un aumento en el contenido de grasa cuando la muestra fue sometida a cocción, pero en menor proporción (10% en lenteja Silvina). Igualmente a lo que pasa con judía, la cocción tampoco afectó significativamente el contenido de grasa en judía de Lima (*Phaseolus lunatus* L.) (Granito y col., 2007) y en judías tipo Pinta y Cannellini (Aguilera, 2009). Sin embargo, se puede indicar que en ambas muestras se observa una tendencia a presentar mayor contenido de grasa en la muestra sometida a cocción, debido a una probable pérdida de sólidos solubles, lo que aumentaría la concentración de grasa en las harinas de semillas cocidas (Wang y col., 2010).

En cuanto a las leguminosas germinadas, se observa un notable incremento en la muestra de judía, alcanzando niveles de 2 mg/100 g ms, mientras que en lenteja el aumento es menos drástico. Una posible explicación a este incremento observado es que puede ser debido a la actividad fotosintética que ejercen los cotiledones del producto germinado (Osman, 2007).

Proteínas

Los resultados de proteína bruta (Tabla 1.1 y Figura 1.7) en las harinas de leguminosas se acercan a 18 g/100 g ms, valores próximos a los contenidos medios (20%) normalmente encontrados en distintas legumbres (Belitz y Grosh, 1997). Los altos niveles de proteínas observados en judía de Tolosa y lenteja de La Armuña demuestran su potencial como fuente alimenticia, pero cabe indicar que una pequeña parte de las sustancias nitrogenadas presentes en los granos de leguminosas no son de naturaleza proteica (bases púricas y pirimídicas, creatinas y creatinina, urea, amoníaco, etc.) y pueden incrementar el valor real de proteínas (Kochhar y col., 1988). En las muestras crudas se observa que la lenteja (22 g/100 g ms) presenta un valor superior a la judía (18 g/100 g ms), y resultan similares a los encontradas en la bibliografía (Aguilera, 2009). Sin embargo, el contenido de proteínas en muestras crudas del presente trabajo resulta superior a otras leguminosas como canavalia (7 g/100 g ms) y judía de Lima (11,1 g/100 g ms), según Betancur-Ancona y col. (2004).

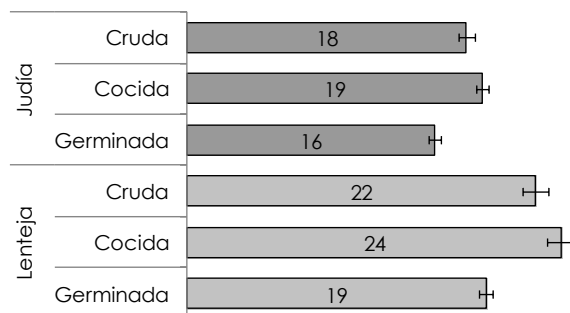


Figura 1.7 – Contenido de proteína bruta de leguminosas crudas y procesadas (g/100 g ms).

El proceso de cocción provoca un incremento en el contenido proteico de ambas leguminosas (Figura 1.7), en judía de un 7% y en lenteja del 5%. Este aumento en los niveles proteicos de las muestras cocidas también fue observado por Almeida Costa y col. (2006), Shiga y col. (2009) y Wang y col. (2009 y 2010) con un máximo de un 10% de incremento en distintos tipos de legumbres, mientras que Aguilera (2009) revela un aumento más acentuado (30%) en lenteja Pardina. Sin embargo, otras publicaciones

(Marconi y col., 2000; Granito y col., 2007) indican una reducción del contenido proteico en muestras cocidas. Estas alteraciones de los niveles de proteína se pueden explicar por una menor o mayor solubilización de sustancias proteicas durante la cocción. El nivel de proteína es un factor clave en la obtención de productos de buena calidad (Novaro y col., 1993), como para promover la construcción de una red proteica difusa y coagulada capaz de atrapar los gránulos de almidón y evitar que se excluyan de una pasta durante su cocción (Resmini y Pagani, 1983).

A diferencia de lo que sucede en la cocción, durante la germinación se observa una reducción de los niveles proteicos en judía (14%) y en lenteja (11%), igualmente observados por Akpapunam y Sefa-Dedeh (1997) en canavalia (14%) y Herken y col. (2007) en caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp.) (3%). Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el contenido de proteína total de las diferentes leguminosas puede verse afectado por diversos factores tales como variedad, aplicación de fertilizante, localización de cultivo y tipo de tratamiento al que se somete la semilla (Akpapunam y Sefa-Dedeh, 1997; Jood y col., 1998; Chel-Guerrero y col., 2002; Iqbal y col., 2006; y Herken y col., 2007).

Carbohidratos

Respecto al contenido de carbohidratos, calculado por diferencia, se observan valores muy próximos entre los resultados de judía y lenteja crudas (74 y 77 g/100g ms) (Tabla 1.1 y Figura 1.8). Estos valores de carbohidratos son similares a los encontrados en la literatura en el caso de lenteja Pardina, judía Pinta y Cannellini (± 74 g/100g ms) (Aguilera, 2009) y judía variedad Carilla (76 g/ 100g ms) (Martín-Cabrejas y col., 2004). Dado que la determinación de los carbohidratos totales se ha realizado a partir de los resultados obtenidos del resto de componentes químicos, sus incrementos o reducciones serán consecuencia del comportamiento de dichos componentes.

El proceso de cocción parece no afectar el contenido total de carbohidratos, ya que los valores de las muestras cocidas son muy similares a las muestras crudas en ambas leguminosas. Asimismo, la muestra cocida de judía (78 g/100 g ms) presenta mayor contenido de carbohidratos que lenteja cocida (73 g/100 g ms). Respecto a la germinación se observa un ligero incremento en lenteja. Según Belitz y Grosh (1997) el principal responsable de estos niveles es la fracción de almidón y en menor proporción la fibra alimentaria, siendo los azúcares solubles los que presentan una menor contribución.

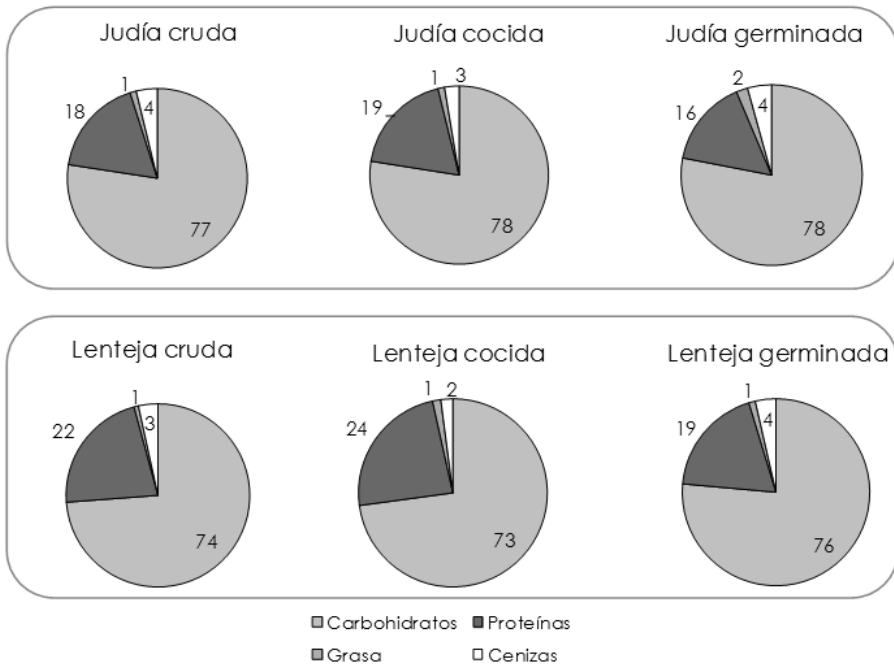


Figura 1.8 – Composición química de leguminosas crudas y procesadas (g/100 g ms).

" Hay que comer para vivir,
y no vivir para comer."

Molière

Capítulo 2 - EFECTO DE LOS PROCESAMIENTOS SOBRE LA FRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS COMPLEJOS EN LEGUMINOSAS

2



Alice Sarmento Rosa

Capítulo 2 - EFECTO DE LOS PROCESAMIENTOS SOBRE LA FRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS COMPLEJOS EN LEGUMINOSAS

2.1 RELEVANCIA DEL ESTUDIO

El descubrimiento de la importancia de la fibra alimentaria ha dado lugar al desarrollo de un relevante mercado alimenticio además, el potencial de los productos e ingredientes ricos en fibra animó a los investigadores a buscar mejores fuentes de fibra alimentaria (Chau y col., 2007). Para satisfacer la demanda del actual mercado consumidor es necesario la elaboración de distintos productos ricos en fibra y con propiedades saludables. En este momento, hay una gran variedad de productos y subproductos agrícolas de los cuales se puede obtener harinas enriquecidas en fibra que provienen de cereales, frutas y hortalizas (Larrauri, 1999). Por lo tanto, se hace necesario el estudio de la fibra de estos productos y de sus propiedades físico-químicas para poder explicar sus funciones en los alimentos y contribuir a la comprensión de sus efectos fisiológicos.

En la actualidad, las leguminosas son objeto de estudio de numerosos trabajos debido a que se tratan de alimentos ricos en carbohidratos, como también debido a su relevante contenido de fibra alimentaria soluble en comparación con otros alimentos vegetales ricos en fibra como los cereales y tubérculos. Por lo tanto, las legumbres resultan de gran interés por su posible utilización en la elaboración de nuevos productos más atractivos para el consumidor. Asimismo, cabe destacar la creciente utilización de harinas de judías y lentejas en nuevos productos, consiguiendo así diferentes texturas y sensaciones (Han y col., 2010).

A pesar del creciente interés de los investigadores por el estudio químico de los componentes de la fibra alimentaria en los últimos años, aún existen alimentos, como las leguminosas, que necesitan un estudio más detallado para comprender cómo el procesado afecta al comportamiento de las distintas fracciones de fibra y sus posibles aplicaciones en formulaciones alimentarias. Existen numerosas investigaciones acerca del análisis químico de la fibra insoluble (FI), fibra soluble (FS) y fibra alimentaria total (FT) de leguminosas crudas y cocidas, sin embargo, otros procesados como la germinación todavía no han sido estudiados detalladamente.

La germinación provoca modificaciones en la estructura de los componentes de la semilla, así como en su composición química, que por una parte se sintetizan nuevas estructuras y compuestos necesarios para el desarrollo vegetal y por otra parte se degradan sustancias de reserva presentes en la semilla (cotiledones en leguminosas) esenciales para la obtención de energía. En este sentido, se han detectado

modificaciones en la composición de carbohidratos solubles, almidón, fitatos, alcaloides, minerales y niveles de vitamina C, entre otros. Todas estas modificaciones pueden beneficiar a la calidad nutricional de los alimentos.

Entre todos los componentes de las semillas de leguminosas es relevante el estudio del contenido de almidón porque llega a constituir hasta el 40% de la composición nutricional de las harinas de legumbres. El almidón es una fuente energética directa y aporta beneficios para la salud, así como propiedades organolépticas y tecnofuncionales favorables en la industria alimentaria (Sridhar y Seena, 2006; Jezierny y col., 2010). Nutricionalmente el almidón es clasificado en tres grupos: almidón de rápida digestión, almidón de digestibilidad baja y almidón resistente. El almidón resistente es definido como el almidón alimentario o dietético, por lo cual no es digerido en el intestino delgado, pero posteriormente es fermentado por la acción de la microflora intestinal (Berry, 1986), similar a la acción que exhibe la fibra alimentaria (Mahadevamma y Tharanathan, 2004). El procesamiento de semillas de leguminosas puede modificar estas relaciones y consecuentemente, la composición de la fracción amilácea así como los constituyentes de la fibra alimentaria.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar el efecto del procesado en la fracción de carbohidratos complejos con respecto a cada una de las leguminosas objeto de estudio:

- el contenido de fibra, y de sus fracciones, en las harinas de leguminosas;
- la composición en azúcares neutros, ácidos urónicos y lignina Klason, en cada fracción de fibra (fibra soluble, fibra insoluble y fibra total);
- los niveles de almidón total y su composición en almidón disponible y almidón resistente.

2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

DETERMINACIÓN DE FIBRA ALIMENTARIA

El contenido en fibra alimentaria se determina según el método 991.43 de la AOAC (1995), en las muestras de lentejas y judías crudas y sometidas a los procesados de cocción y germinación. Tras el tratamiento enzimático (α -amilasa, proteasa y amiloglucosidasa) algunos compuestos que no forman parte de la fibra (almidón y compuestos proteicos solubles) son eliminados, dando como resultado un compuesto denominado residuo gravimétrico de la fibra (Figura 2.1A). El método enzimático permite

separar las fracciones soluble e insoluble de la fibra alimentaria: utiliza enzimas amilolíticos y proteolíticos para solubilizar el almidón y las proteínas (Prosky y col., 1985).

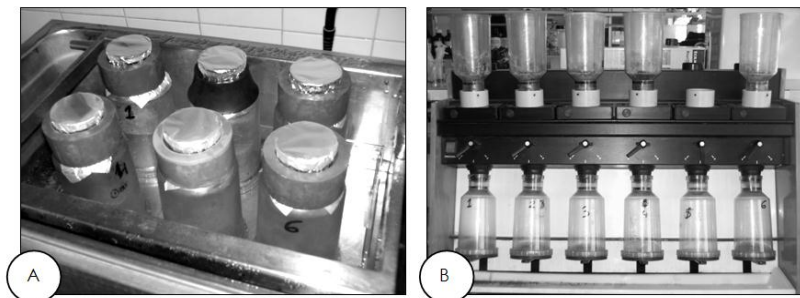


Figura 2.1 - (A) Tratamiento enzimático de harina de leguminosas y (B) sistema Fibertec de separación de fibra insoluble y fibra soluble.

Los residuos gravimétricos (RG) que permanecen después del tratamiento enzimático, se filtran por el sistema Fibertec (Figura 2.1B) y se someten a diferentes lavados con agua a una temperatura de 70 °C. En este filtrado se encuentran los residuos solubles en agua, las cuales se precipitan con etanol. Los residuos insolubles y los residuos solubles en agua se lavan con etanol (78 y 99%) y acetona. Una vez filtrados, los residuos gravimétricos permanecen en una estufa a 105 °C durante 18 horas, que posteriormente son enfriados en desecador y pesados, para que a partir del valor de Residuo Gravimétrico Insoluble (RGI) y Residuo Gravimétrico Soluble (RGS) se calcule el rendimiento en Fibra Insoluble (FI) y Fibra Soluble (FS), respectivamente. De los residuos obtenidos se hacen correcciones en cuanto a los contenidos en proteínas y cenizas. La determinación de las cenizas (en horno tipo mufla a 525 °C durante 4 horas) y proteínas (mediante Kjeldahl $N \times 6,25$) se realizó según métodos oficiales (métodos 942.05 y 32.1.22, respectivamente; AOAC, 1995) y se lleva a cabo a partir de los residuos gravimétricos. Se efectúan las correspondientes correcciones:

$$FI = RGI - \text{Proteínas fracción insoluble} - \text{Cenizas fracción insoluble}$$

$$FS = RGS - \text{Proteínas fracción soluble} - \text{Cenizas fracción soluble}$$

$$FT = FI + FS$$

HIDRÓLISIS DE LOS COMPONENTES DE LA FIBRA ALIMENTARIA

Entre los principales componentes de la fibra alimentaria destacan la celulosa, las hemicelulosas y las pectinas, a los cuales se suma la lignina, aunque se trate de un polímero de naturaleza fenólica. Además, se incluyen las numerosas fracciones glucídicas vegetales como los mananos, galactomananos, glucomananos presentes en

gran proporción en las leguminosas. La naturaleza de los constituyentes de base, recogidos después de una hidrólisis química apropiada, es de gran utilidad para identificar el polímero original como las pentosas (arabinosa, xilosa) que provienen exclusivamente de las hemicelulosas (o pentosanas); los ácidos urónicos, esencialmente de las sustancias pécticas; la glucosa, de la hidrólisis del almidón y de la celulosa (Adrian y col., 2000).

Los componentes químicos que constituyen la fibra alimentaria se obtienen mediante una hidrólisis ácida de los residuos de la fibra insoluble y soluble, aislados tras el tratamiento enzimático (Lee y col., 1992). Los residuos gravimétricos de fibra insoluble se someten a una hidrólisis secuencial en H_2SO_4 12 M (hidrólisis fuerte) a temperatura ambiente (3 horas), seguido de otra hidrólisis H_2SO_4 0,6 M durante 3 horas a 100 °C en un baño de agua. También es necesario someter otras muestras de residuo insoluble a una hidrólisis suave (H_2SO_4 0,6 M), porque algunos azúcares se degradan en hidrólisis fuerte. Los residuos de fibra soluble solamente se someten a una hidrólisis suave en H_2SO_4 0,6 M durante 3 horas a 100 °C, pues se ha demostrado que aplicar una hidrólisis fuerte a la fracción soluble de la fibra provoca la degradación de los carbohidratos que la componen (Martín-Cabrejas y col., 2006). Durante la hidrólisis en ácido sulfúrico 12 M va a tener lugar la formación de ésteres de sulfato de celulosa, mientras que en la hidrólisis en ácido sulfúrico 0,6 M se producirá la ruptura de los ésteres formados y la regeneración de los monosacáridos libres (Garleb y col., 1989). El objetivo de la hidrólisis ácida es conseguir la liberación de los principales componentes de la fibra alimentaria (azúcares neutros, ácidos urónicos y lignina Klason).

La mezcla hidrolizada es filtrada utilizando un crisol nº 4 y se añade al filtrado un patrón interno de eritritol (polialcohol) imprescindible para la posterior determinación de los azúcares neutros por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). La cantidad de eritritol (en 1 ml de agua desionizada) a ser añadida a cada hidrolizado es:

$$\text{Eritritol (mg)} = (\text{Volumen del hidrolizado en litros} + 0,001 \text{ litro}) \times 542 \text{ mg/l}$$

542 mg/l – se utiliza esta concentración para que al final de todo el proceso todas las muestras tengan una misma concentración de eritritol, igual a 1356 mg/l, para todos los hidrolizados de muestra y para los patrones. Los residuos insolubles, que se obtienen tras la hidrólisis fuerte (H_2SO_4 12 M), y que son retenidos en los crisoles nº 4, se cuantifican gravimétricamente como lignina Klason. Para ello se pesan los crisoles (precisión de $\pm 0,1$ mg), previamente secados en una estufa a 105 °C, durante 18 horas, y enfriados a temperatura ambiente en desecador.

DETERMINACIÓN DE AZÚCARES NEUTROS Y ÁCIDOS URÓNICOS

Para la determinación individual de los azúcares neutros presentes en la fracción de fibra se utilizan los hidrolizados preparados como se indica en el apartado anterior. Se procedió, inicialmente, a la neutralización de los hidrolizados (5 ml) utilizando una columna de resina de intercambio iónico AG4-X4 (Bio- Rad). El filtrado que se extrae de las columnas de resina se seca utilizando un rotavapor, se disuelve en agua desionizada (2 ml) y se filtra a través de un Sep-Pack y un filtro Millex HV13 (0,45 µm), antes de inyectarse en el sistema cromatográfico. La composición en azúcares neutros de los hidrolizados es determinada utilizando un sistema de HPLC. El sistema analítico utilizado para separar los azúcares neutros consiste en una precolumna (Aminex Carbo-P, Bio-Rad) en serie con una columna de análisis de carbohidratos (Aminex HPX-87P, Bio-Rad) utilizando un detector de índice de refracción. Los picos cromatográficos son identificados por comparación de los tiempos de retención de los picos desconocidos con su correspondiente patrón de la curva de calibrado (Jaime y col., 2002). En el caso de la ramnosa y galactosa se produce una coelución, como también sucede con la manosa que coincide su tiempo de retención con la fructosa. La cuantificación de los patrones de azúcares neutros (arabinosa, xilosa, galactosa, glucosa y manosa) y la disposición de la curva de calibrado para cada uno de los monosacáridos estudiados se basa en la adición del patrón interno eritritol. Para la composición de los cromatogramas y el cálculo de las concentraciones de los carbohidratos se utiliza el programa System Gold 7.0.

La determinación de ácidos urónicos se realiza mediante colorimetría utilizando como reactivo el m-hidroxidifenilo (MHDP) y como patrón ácido galacturónico monohidratado (Blumenkrantz y Asboe-Hansen 1973). Se realiza en un medio altamente ácido (tetraborato sódico 0,0125 M en ácido sulfúrico concentrado), donde son hidrolizados los ácidos poligalacturónicos (presentes en los hidrolizados extraídos según en el apartado anterior) en unidades de ácido galacturónico y transformado en ácido 5-formilfuroico, que se condensa con el reactivo colorimétrico, altamente selectivo, formando complejos coloreados cuya densidad óptica está en función de la concentración de ácido galacturónico, medidos a una longitud de onda de 520 nm.

CUANTIFICACIÓN DEL ALMIDÓN

El contenido en almidón total se determina de acuerdo con Vidal-Valverde y col. (1998), según el método basado en la digestión enzimática total de almidón a glucosa. El contenido en glucosa se mide de acuerdo con Dahlqvist (1964) y el contenido en almidón total se calcula multiplicando el contenido en glucosa por 0,9. El almidón disponible se determina de acuerdo al método desarrollado por Li y col. (1985).

La preparación de la muestra para la posterior determinación del almidón se inicia a partir de la obtención del residuo insoluble en alcohol (RIA). Se pesan 3 g de muestra, en tubos de centrifuga, y se suspenden en 50 ml de etanol al 80% (v/v) para extraer los azúcares solubles en alcohol. La mezcla se lleva a ebullición durante 15 minutos, se enfría y se centrifuga durante 5 minutos a velocidad de 3500 rpm, el sobrenadante se descarta y se vuelve a lavar el material sólido con 50 ml de etanol. Este proceso de extracción de los azúcares libres se vuelve a repetir, hasta que el sobrenadante resulte negativo en el Test de Mölich (Pearson, 1975). El material sólido (RIA), ausente de azúcares libres, se lava por última vez con 50 ml más de etanol, mediante vacío a través de una placa filtrante n° 2, que posteriormente se seca en estufa a 105 °C durante 18 horas.

A continuación, se colocan 0,1 g de RIA con 15 ml de agua destilada en un autoclave (1h 15 min 1,1 atm de presión y 135 °C) para que el almidón se gelatinice. La hidrólisis para liberar la glucosa se lleva a cabo sometiendo el residuo a una digestión enzimática con 50 µl de amiloglucosidasa, 750 µL de tampón acético/acetato 0,2 N pH 4,5 y, finalmente, 750 µL de agua destilada, que transforma el almidón libre en glucosa. Dependiendo del tiempo transcurrido durante la incubación enzimática (baño de agua 37 °C) se determina el almidón hidrolizado como almidón disponible (30 minutos) o almidón total (3 horas). Para interrumpir esta reacción la mezcla permanece durante 10 minutos a 100 °C, posteriormente se filtra (papel Whatman n° 1) y el sobrenadante se enrasa a 100 ml. La determinación se realiza mediante ensayo colorimétrico utilizando como reactivo transaminasa glutámico oxalacética (TGO). Para su preparación se pesan 10 mg de la enzima glucosa-oxidasa y se disolvieron en 50 ml de solución tamponada Tris pH 7, manteniéndolo en continua agitación durante 30 segundos. Posteriormente se añaden 0,5 ml de solución peroxidasa (10 mg de peroxidasa en 10 ml de agua destilada), 0,5 ml de solución orto-dianisidina (10 mg en 1 ml de etanol al 95%) y 1 ml de solución detergente Tritón X-100 (1 ml en 4 ml de etanol 95%). Por último, se enrasa con agua destilada hasta un volumen final de 100 ml y se filtra a través de una placa filtrante n° 1.

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diversos estudios tratan sobre los efectos de diferentes procesamientos en semillas de leguminosas y como estos tratamientos afectan a los componentes de la fibra alimentaria (FA) (Pérez-Hidalgo y col., 1997; Rehinan y col., 2004; Barampama y Simard, 1995). Sin embargo, existe menos información acerca de los efectos del proceso de germinación sobre las fracciones de la fibra alimentaria en muestras de leguminosas (Martín-Cabrejas y col., 2003).

FIBRA ALIMENTARIA: CUANTIFICACIÓN ENZIMÁTICA-GRAVIMÉTRICA

Los resultados de la composición gravimétrica de la fibra alimentaria se encuentran en la Tabla 2.1. Respecto al nivel de FI presente en las leguminosas crudas, se observa que es más alto en la muestra de lenteja (245 mg/g ms) que en la muestra cruda de judía (215 mg/g ms). Además, los resultados de FI en muestras crudas de leguminosas presentan contenidos de fibra relativamente altos, superiores a los de otras legumbres como la judía variedad Carilla (171 mg/g ms) (Martín-Cabrejas y col., 2004) y lenteja variedad Silvana (190 mg/g ms) (Almeida Costa y col., 2006) y más elevados que los de cereales (Esteban y col., 1998; Bednar y col., 2001; Li y col., 2002). Asimismo, en las legumbres estudiadas, la fracción insoluble de la fibra (Figura 2.2) representa entre el 73% y el 94% del total de fibra alimentaria, siendo las muestras de lenteja las que más porcentaje de FI presentan (91% a 94% de la FT). Bednar y col. (2001) analizando la composición de legumbres, observaron que la fibra insoluble representaba un 93% en las muestras de judía y 100% en lenteja, del total de fibra alimentaria.

En lo que se refiere al contenido de FS, en las muestras crudas, se observa en la Tabla 2.1 que el contenido de esta fracción es notablemente diferente dependiendo de la leguminosa estudiada. De esta forma, se observa un nivel más alto en el caso de la muestra de judía (58 mg/g ms) que en lenteja (24 mg/g ms), ambas muestras crudas. Estos resultados están de acuerdo con los encontrados en la literatura para diversas muestras de leguminosas comunes (Bednar y col., 2001; Li y col., 2002; Martín-Cabrejas y col., 2004; Aguilera, 2009).

Tabla 2.1 – Composición gravimétrica de la fibra alimentaria: insoluble (FI), soluble (FS) y total (FT); de leguminosas crudas y procesadas (mg/g ms).

	Muestra	FI	FS	FT	FI/FS
Judía	Cruda	214,6 ± 3,4 ^a	57,8 ± 1,1 ^b	272,4	4/1
	Cocida	218,6 ± 2,3 ^a	59,7 ± 0,7 ^c	278,3	4/1
	Germinada	288,6 ± 11,3 ^b	55,3 ± 1,4 ^a	343,9	5/1
Lenteja	Cruda	244,6 ± 2,0 ^c	24,0 ± 3,5 ^c	268,6	10/1
	Cocida	210,4 ± 3,8 ^b	17,6 ± 2,7 ^b	228,0	12/1
	Germinada	188,5 ± 1,6 ^a	12,8 ± 1,8 ^a	201,3	15/1

Los valores son medias ± DE, n=3. Las medias dentro de una columna y leguminosa con diferente superíndice son significativamente diferentes para P<0,05.

Si se analizan los valores de fibra total (FT) de las leguminosas crudas, se observa que judía (272 mg/g ms) presenta mayor contenido en fibra que lenteja (268 mg/g ms), y que estos valores son similares a la bibliografía (Su y Chang, 1995; Li y col., 2002; Mahadevamma y Tharanathan, 2004; Martín-Cabrejas y col., 2004). Sin embargo, los

valores de fibra total de las muestras crudas de las leguminosas objeto de estudio son superiores a judía Pinta (218 mg/g ms) y a lenteja Pardina (243 mg/g ms) (Aguilera, 2009). De acuerdo con la literatura (Bednar y col., 2001), las leguminosas son alimentos ricos en fibra total (332 a 420 mg/g ms), cuyos valores superan a los cereales, como la cebada (170 mg/g ms), el maíz (190 mg/g ms) y el arroz (15 mg/g ms).

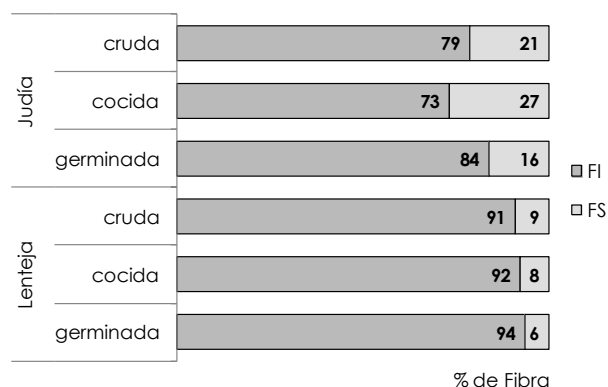


Figura 2.2 - Porcentaje de fibra insoluble (FI) y fibra soluble (FS) en muestras de leguminosas crudas y procesadas (%).

En general, al someter las muestras a los procesamientos se observan cambios significativos en el contenido de fibra alimentaria (Tabla 2.1), afectando de diferentes formas a cada leguminosa en cuestión. En el tratamiento térmico (cocción) se produce una reducción del 14% de FI en la muestra de lenteja, mientras que en la muestra de judía no hay cambios significativos. Por otro lado, apenas se observa cambios en FS en la muestra cocida de judía (3% de incremento), mientras que en la muestra cocida de lenteja la fracción soluble disminuye un 27%. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los estudios de Kutos y col. (2003), Almeida Costa y col. (2006), Aguilera (2009) y Wang y col. (2010) que muestran incrementos de FS en garbanzos, guisantes y judías, mientras que otras publicaciones (Granito y col., 2007; Aguilera, 2009; Wang y col., 2009) indican una reducción de la fracción soluble en la cocción. Sin embargo, Vidal-Valverde y Frias (1991) y Vidal-Valverde y col. (1992) sugieren una degradación de la fibra soluble durante el proceso de cocción, provocando la reducción de su contenido. Por consiguiente, el proceso de cocción provoca en la FT comportamientos distintos dependiendo de la leguminosa estudiada. Si por un lado, en la muestra cocida de judía apenas se observan cambios en la FT, por otro lado, el tratamiento térmico causa una importante reducción (15%) en la FT de lenteja, respecto a la muestra cruda. Según la bibliografía, los incrementos que experimenta la fibra alimentaria se deben

principalmente a la formación de almidón resistente y a los productos de la reacción de Maillard que se forman durante el proceso de cocción (Su y Chang, 1995).

En relación a la germinación este proceso provoca cambios aún más significativos en la FI, destacando la muestra de judía, cuyo incremento alcanza el 34%, mientras que para la muestra de lenteja se observa una reducción de 23%. En lo que respecta a la FS, los resultados muestran una reducción de fibra más destacada en lenteja (47% de descenso) que en judía (4%). Asimismo, durante el proceso de germinación el contenido de fibra alimentaria total se ve incrementado en la judía (26%) y reducido en la lenteja (25%). Los incrementos observados pueden ser debidos a una mayor solubilización de sustancias pécticas, las cuales presentan una estructura ramificada y son más susceptibles de sufrir una ruptura durante este proceso (Pérez-Hidalgo y col., 1997; Almeida Costa y col., 2006). El diferente comportamiento observado en el contenido de fibra alimentaria de las leguminosas durante la germinación, puede ser debido a la distinta estructura y composición de sus paredes celulares.

Los cambios que se producen a lo largo de todo el proceso se reflejan en la relación FI/FS (Tabla 2.1), mostrando que el procesamiento de las semillas de leguminosas pueden modificar las características de la fibra alimentaria. Esta relación se asocia con propiedades estructurales y también sensoriales que presentan las leguminosas (Jenkins y col., 1998). Los resultados obtenidos de dicha relación revelan notables diferencias entre las muestras crudas de lenteja (10/1) y judía (4/1). La cocción aumenta esta relación en lenteja (de 10/1 a 12/1), mientras que en judía no se observan cambios; por otro lado, la germinación provoca incrementos más significativos en judía (de 4/1 a 5/1) y en lenteja (de 10/1 a 15/1). La relación FS/FI revela que tanto el tratamiento térmico como la germinación son capaces de modificar las características físico-químicas de las fracciones de fibra alimentaria.

FIBRA ALIMENTARIA: CUANTIFICACIÓN ENZIMÁTICA-QUÍMICA

Fibra insoluble (FI)

Muestras crudas

De acuerdo con los resultados de la Tabla 2.2, el contenido total de la fracción insoluble de la fibra, como suma de sus constituyentes, muestra notables diferencias entre las legumbres estudiadas, en el cual se aprecian valores de 139 mg/g ms en el caso de la lenteja y 170 mg/g ms en la judía. Estos resultados son próximos a otros estudios con leguminosas como la judía Carilla (160 mg/g ms) (Martín-Cabrejas y col., 2004) y la lenteja Pardina (170 mg/g ms) (Aguilera, 2009).

En general, la FI de las muestras crudas de las leguminosas estudiadas, está compuesta principalmente por glucosa (41% en judía y 45% en lenteja), arabinosa (22% y 18%) y ácidos urónicos (14% y 17%) como los componentes principales de los carbohidratos, seguido por xilosa, galactosa y manosa, que se encuentran en cantidades menores (Figura 2.3). Estos valores son similares a los datos publicados para guisante variedad Arvense cv. Esla (Martín-Cabrejas y col., 2003), garbanzo Sinaloa y lenteja Pardina (Aguilera, 2009).

El contenido de AU de la FI es similar en ambas leguminosas (23 mg/g ms), y es próximo al valor encontrado por Martín-Cabrejas y col. (2004) para judía Carilla (28 mg/g ms), pero superior a lenteja Pardina (10 mg/g ms) estudiada por Aguilera (2009). El contenido de xilosa es similar en ambas leguminosas (10 mg/g ms) y próximo a la muestra de lenteja Pardina (13 mg/g ms) (Aguilera, 2009), pero son superiores a judía Carilla (4,6 mg/g ms) (Martín-Cabrejas y col., 2004). Los residuos obtenidos tras la hidrólisis ácida fuerte de la FI se conocen como Lignina Klason. Este componente muestra diferencia significativa en función de la leguminosa. La muestra de judía cruda (21 mg/g ms) presenta mayor contenido de lignina que la de lenteja (10 mg/g ms).

Tabla 2.2 – Composición de carbohidratos de la fibra insoluble de leguminosas crudas y procesadas (mg/g ms).

		Carbohidratos						Total	Lignina	Total*
Muestra/ Hidrólisis H ₂ SO ₄		Ara	Xil	Man	Gal	Glc	AU	(AN + AU)	Klason	
Judía	Cruda /12 M	37,2 ± 0,3^B	9,7 ± 1,4^B	3,7 ± 0,1^A	5,4 ± 0,5^B	69,2 ± 1,8^B	22,7 ± 0,9^B	148,0 ± 1,4^B	20,8 ± 1,3^B	170,1 ± 2,9^{AB}
	0,6 M	35,7 ± 0,1 ^a	7,6 ± 0,4 ^b	3,3 ± 0,1 ^a	6,8 ± 0,3 ^{ab}	37,2 ± 3,1 ^b	15,9 ± 0,1 ^b	106,4 ± 3,2 ^b		
	Cocida /12 M	30,9 ± 0,2^A	6,8 ± 0,0^A	4,1 ± 0,1^A	3,7 ± 0,3^A	85,5 ± 1,2^C	14,7 ± 1,3^A	146,0 ± 0,0^B	12,7 ± 1,0^A	163,4 ± 1,6^A
	0,6 M	31,9 ± 0,6 ^a	6,1 ± 0,4 ^a	5,0 ± 0,6 ^b	6,8 ± 0,6 ^a	39,1 ± 2,0 ^b	12,0 ± 0,1 ^a	100,8 ± 1,1 ^{ab}		
	Germinada /12 M	42,8 ± 0,8^C	10,3 ± 0,1^B	5,7 ± 0,4^B	5,4 ± 0,5^B	46,0 ± 1,4^A	24,8 ± 1,8^B	135,0 ± 0,0^A	34,7 ± 0,4^C	173,5 ± 1,6^B
	0,6 M	41,5 ± 2,0 ^b	9,1 ± 0,4 ^c	6,8 ± 0,6 ^c	8,1 ± 0,1 ^b	11,5 ± 0,7 ^a	15,9 ± 1,3 ^b	92,8 ± 4,2 ^a		
Lenteja	Cruda /12 M	24,1 ± 0,1^A	10,4 ± 1,0^{AB}	1,7 ± 0,1^{AB}	5,9 ± 0,2^B	62,8 ± 1,0^B	23,9 ± 1,2^A	129,0 ± 1,4^B	9,8 ± 0,0^A	138,6 ± 1,7^B
	0,6 M	23,2 ± 0,3 ^a	7,4 ± 0,8 ^a	1,1 ± 0,1 ^a	4,2 ± 0,3 ^a	33,2 ± 4,5 ^b	10,8 ± 0,9 ^a	79,8 ± 6,2 ^b		
	Cocida /12 M	29,7 ± 1,8^B	7,8 ± 1,1^A	1,4 ± 0,2^A	4,7 ± 0,4^A	106,4 ± 4,7^C	20,3 ± 1,1^A	170,5 ± 9,2^C	17,6 ± 1,8^B	192,3 ± 5,7^C
	0,6 M	33,3 ± 0,7 ^b	7,7 ± 0,1 ^a	1,7 ± 0,3 ^b	5,2 ± 0,4 ^a	41,3 ± 2,5 ^b	10,5 ± 0,1 ^a	99,5 ± 1,6 ^c		
	Germinada /12 M	24,5 ± 1,1^A	12,8 ± 1,1^B	2,1 ± 0,2^B	7,8 ± 0,3^C	37,0 ± 2,0^A	24,3 ± 2,0^A	108,0 ± 5,7^A	6,7 ± 0,1^A	123,5 ± 4,0^A
	0,6 M	32,8 ± 0,4 ^b	10,4 ± 0,1 ^b	2,0 ± 0,1 ^b	4,0 ± 0,8 ^a	3,5 ± 0,4 ^a	15,2 ± 0,9 ^b	67,6 ± 1,6 ^a		

Los valores son medias ± DE, n=3. Las medias dentro de una columna y leguminosa con diferente superíndice son significativamente diferentes para P<0,05.

En negrita – hidrólisis fuerte 12 M H₂SO₄; la línea justamente abajo expresa los valores de hidrólisis suave 0,6 M H₂SO₄.

*Total de carbohidratos: suma de los mayores valores observados entre 12 M y 0,6 M.

AN: azúcares neutros, AU: ácidos urónicos, Ara: arabinosa, Xil: xilosa, Man: manosa, Gal: galactosa, Glc: glucosa.

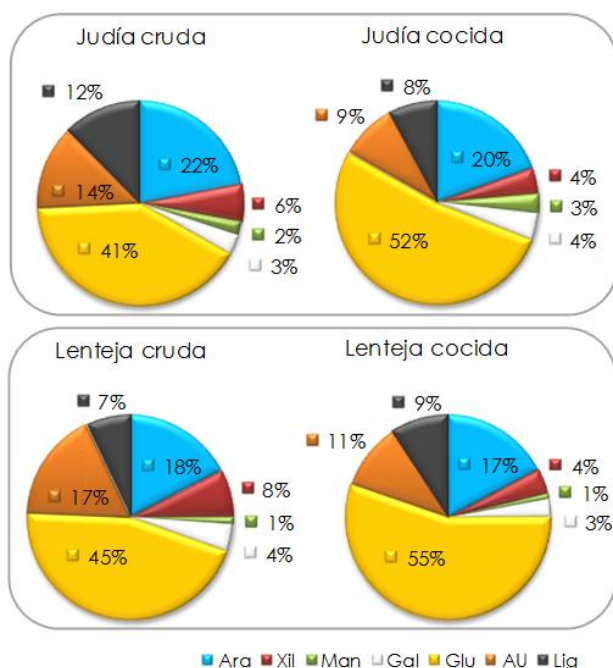
Muestras cocidas

El procesado afecta de diferentes formas al contenido total de carbohidratos de la FI. Es acentuado el incremento en azúcares observado en lenteja sometida a cocción (39%), mientras que en judía apenas se observan cambios relevantes (Tabla 2.2). Aguilera (2009) también observó un incremento en la muestra cocida de lenteja Pardina (16%) y un notable aumento de carbohidratos totales en garbanzo Sinaloa cocido (56%). El aumento en los niveles de carbohidratos se debe principalmente a la glucosa, que cuenta con incrementos del orden de 23% en judía, llegando a 69% en lenteja, aunque se aprecian pérdidas de xilosa y AU. El aumento de glucosa puede deberse al hinchamiento o dilatación de los granos de almidón provocado por el tratamiento térmico, de esta forma estos granos permanecen atrapados en la matriz de la fibra, y resulta más difícil su solubilización por la acción de las enzimas en el proceso de extracción de la fibra.

De este modo, los tratamientos térmicos producirían la insolubilización de compuestos que contienen glucosa. Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente en la literatura (Jenkins y col., 1998; Rehinan y col., 2004), donde se observan cambios en los contenidos de fibra alimentaria (almidón resistente y polisacáridos no amiláceos) procedentes de harinas de legumbres cocidas. Asimismo, otros trabajos muestran que el proceso de cocción incrementa el contenido de FI, siendo mayores los incrementos cuando se utiliza la presión y el vapor (Cheung y Chau, 1998; Kawale y col., 2005). Los diferentes resultados encontrados en la bibliografía se pueden atribuir bien a las distintas características que presentan los tipos de legumbres estudiados así como a la metodología utilizada para la extracción de la fibra alimentaria.

En cuanto al contenido de lignina, el procesamiento afecta de forma diferente las leguminosas estudiadas, mientras que en judía se percibe una reducción (39%), en la muestra de lenteja la cocción provoca un notable incremento (80%) debido probablemente a la formación de nuevos productos insolubles (componentes de Maillard). Estos resultados están de acuerdo con los encontrados en otros alimentos procesados (Rehinan y col., 2004). El contenido de lignina observado en las leguminosas estudiadas es inferior a la muestra cocida de lenteja Pardina (58 mg/g ms) (Aguilera, 2009). Según la bibliografía (Martín-Cabrejas y col., 1997, 2003, 2006) cuando los valores de lignina son muy altos es, posiblemente, debido a la presencia en la pared celular de residuos de proteínas intracelulares coprecipitados.

En resumen, se observa que la fibra insoluble está formada principalmente por glucosa y que la cocción incrementa notablemente los niveles de este monosacárido (Figura 2.3).



AU: ácidos urónicos, Ara: arabinosa, Xil: xilosa, Man: manosa, Gal: galactosa, Glc: glucosa, Lig: lignina

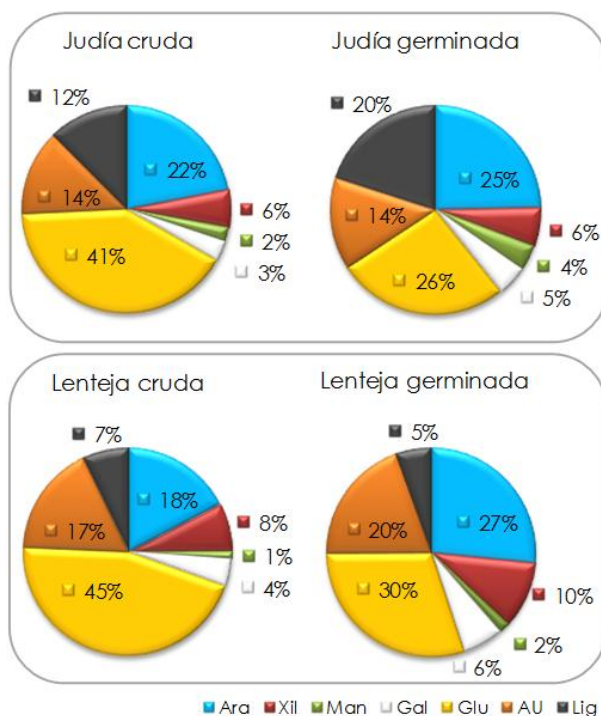
Figura 2.3 - Composición en azúcares neutros, AU y lignina de la fibra insoluble de leguminosas crudas y cocidas (%).

Muestras germinadas

En cuanto a la germinación no se aprecian modificaciones en el contenido de carbohidratos totales en judía, mientras que este proceso reduce los azúcares totales en lenteja (11%) (Tabla 2.2). Martín-Cabrejas y col. (2003) estudiando muestras de guisantes sometidos a germinación observaron un incremento en el contenido de carbohidratos totales, respecto a las muestras crudas. El estudio detallado de los carbohidratos de la fibra insoluble de legumbres germinadas muestra que el contenido de glucosa se ve reducido notablemente en ambas leguminosas en dicho proceso. Estos resultados pueden deberse, en parte, a un aumento de la actividad α -amilasa que probablemente reduce el contenido de almidón resistente, resultado de los cambios fisiológicos en el desarrollo del brote.

Las muestras germinadas (Figura 2.4) están constituidas en gran parte por glucosa ($\pm 28\%$), arabinosa ($\pm 26\%$) y AU ($\pm 17\%$), los demás componentes se encuentran en menor proporción, excepto en judía germinada que presenta un significativo contenido de lignina (20%). Los importantes niveles de glucosa se hace suponer que en la fibra de muestras germinadas (7 días) permanece parte del almidón. De manera que la

germinación implica una serie de cambios en los componentes de las paredes celulares de semillas de leguminosas.



AU: ácidos urónicos, Ara: arabinosa, Xil: xilosa, Man: manosa, Gal: galactosa, Glc: glucosa, Lig: lignina

Figura 2.4 - Composición de azúcares neutros, AU y lignina de la fibra insoluble de leguminosas crudas y germinadas (%).

Solubilización de los carbohidratos según el tipo de hidrólisis ácida (fuerte y suave)

De acuerdo con los resultados de la Tabla 2.2, cada leguminosa presenta un diferente comportamiento frente a la hidrólisis ácida, debido a la diferente estructura y composición de la pared celular de cada una de ellas (Brett y Waldron, 1996). En este sentido, dependiendo del grado de acidez de la hidrólisis se solubilizarán azúcares de origen celulósico, si se extraen con hidrólisis fuerte (H_2SO_4 12 M), o bien serán azúcares de origen hemicelulósico y/o péctico, si se extraen con hidrólisis suave (H_2SO_4 0,6 M). Según la bibliografía consultada (Martín-Cabrejas y col., 2003, 2006) se conoce que la concentración de glucosa procedente de la hidrólisis suave corresponde en parte a la degradación del almidón resistente. Por lo tanto, una manera fiable de conocer la hidrólisis total del almidón por vía enzimática durante la determinación de fibra es observar el contenido de glucosa procedente de la hidrólisis suave; si este nivel es mayor del 10% obtenido en la hidrólisis fuerte se puede asegurar que la muestra contiene

almidón resistente que no se hidroliza durante la digestión enzimática, sino que permanece muy unido al resto de polisacáridos de la pared celular.

En relación a los resultados de glucosa en ambas hidrólisis (fuerte y suave), se observa que sólo la lenteja germinada muestra un porcentaje de 9% de glucosa en la hidrólisis suave (Tabla 2.2); en el resto de muestras tanto de lenteja cruda y cocida como en las muestras de judía los porcentajes son muy superiores al 10% (Figura 2.5). Por lo tanto, los valores obtenidos ponen de manifiesto los importantes niveles de almidón en los residuos de fibra. Es preciso resaltar los mayores porcentajes en las muestras crudas de judía (54%) y de lenteja (53%), seguido de las muestras cocidas de judía (46%) y lenteja (39%), siendo los menores niveles de glucosa observados en las muestras germinadas de judía (25%) y de lenteja (9%), como anteriormente se ha señalado.

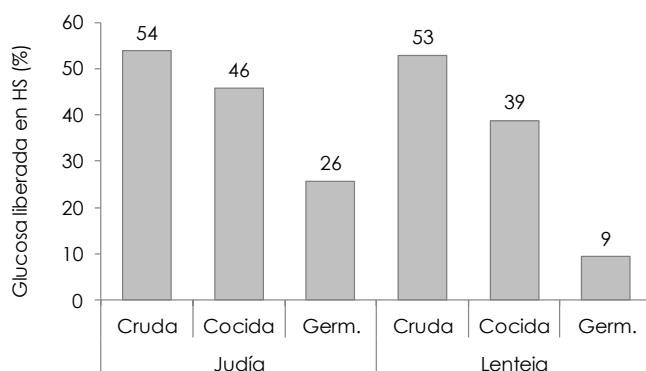


Figura 2.5 - Porcentaje de glucosa extraída en hidrólisis suave (HS: H_2SO_4 0,6 M) con respecto al contenido extraído en hidrólisis fuerte (HF: H_2SO_4 12 M).

En la bibliografía también se ha observado una elevada cantidad de glucosa solubilizada en hidrólisis suave, encontrada en lenteja Pardina cruda (45%) y sometida a remojo (39%) (Aguilera, 2009), aunque en muestras cocidas y en muestras cocidas + deshidratadas de lenteja el contenido de glucosa liberada en hidrólisis suave es de 23% y 15% respectivamente, lo que indica que parte del almidón presente en las muestras crudas se pierde a medida que la muestra se somete a tratamientos como remojo, cocción y deshidratación. Martín-Cabrejas y col. (2004) encontraron que la glucosa solubilizada en hidrólisis suave en las muestras crudas de judía Carilla se situaba en torno al 46% y a medida que se procesaba la muestra se observó una mayor presencia de glucosa, alcanzando un 50% en las muestras fermentadas y un 70% en las muestras fermentadas con posterior proceso de autoclave. Sin embargo, en el presente trabajo, en las muestras procesadas se observa una reducción en el porcentaje de glucosa

solubilizada en hidrólisis suave (HS: H_2SO_4 0,6 M), respecto a la hidrólisis fuerte (HF: H_2SO_4 12 M) en ambas leguminosas (Figura 2.5).

En cuanto al azúcar arabinosa, el segundo mayoritario, proviene de polisacáridos pécicos, por lo que su mayoría se solubiliza en hidrólisis suave (Figura 2.6). Estos resultados indican la existencia de arabinanos no unidos a la matriz celulósica en las leguminosas crudas y procesadas del presente estudio. Asimismo, en las muestras de judía se observa que el contenido de arabinosa es prácticamente el doble que el contenido de ácidos urónicos, lo que indica la presencia de polisacáridos pécicos muy ramificados, sin embargo, en lenteja los porcentajes entre arabinosa y AU son muy próximos, lo que sugiere una clara diferencia entre la estructura y la composición de los polisacáridos pécicos constituyentes de la fibra insoluble de judía de Tolosa y lenteja de La Armuña.

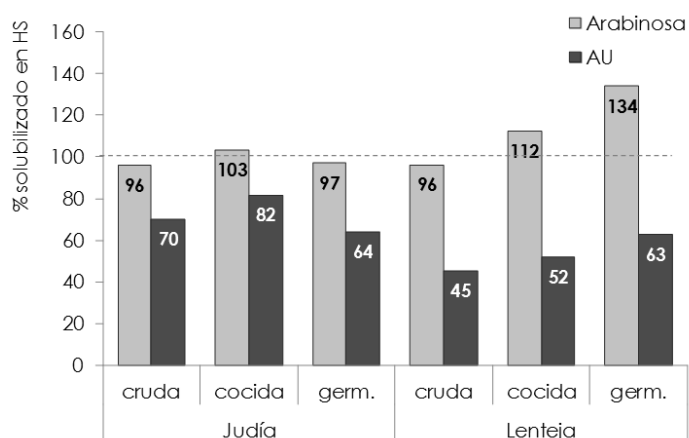


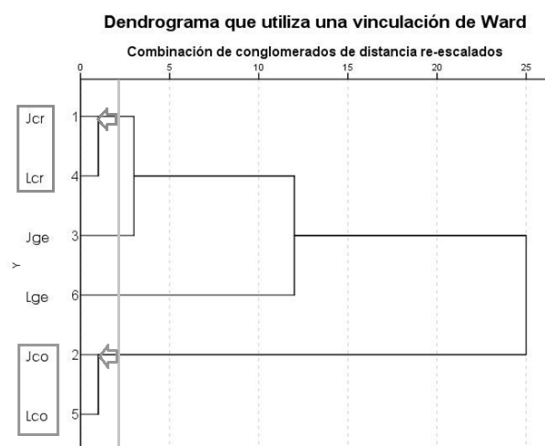
Figura 2.6 - Porcentaje de arabinosa y ácidos urónicos (AU) extraídos en hidrólisis suave (HS: H_2SO_4 0,6 M) respecto a la hidrólisis fuerte (HF: H_2SO_4 12 M).

Por otra parte, los ácidos urónicos, tercer azúcar mayoritario, tienen un comportamiento diferente en comparación con la arabinosa (Figura 2.6). Los AU se solubilizan en condiciones suaves entre 64% y 82% en el caso de judía y entre 45% y 63% en el caso de lenteja, respecto a los valores de la hidrólisis fuerte, lo que puede indicar la presencia de ciertos homogalacturonanos unidos a la matriz de celulosa, similar al observado por Martín-Cabrejas y col. (2003). Estos resultados señalan que microfibrillas de celulosa estaban estrechamente vinculados a los polisacáridos pécicos (homogalacturonanos y arabinanos).

Estudios indican que las altas cantidades de glucosa y la escasa presencia de xilosa confirman que las muestras están compuestas principalmente por almidón resistente (Shiga y col., 2003). De acuerdo con esta afirmación, en el presente trabajo, se aprecia

que los niveles de xilosa (6% del total de FI) y de manosa (2% del total de FI) son más bajos que los niveles de glucosa no celulósica (hidrólisis suave), lo que indica que la mayoría de la glucosa liberada bajo las condiciones de hidrólisis suave provienen del almidón resistente y que la fibra de leguminosas está compuesta por cantidades muy bajas de hemicelulosas (xilanos y mananos). Numerosos estudios demuestran que microfibrillas de celulosa se asociaron fuertemente con xiloglucanos en las paredes de las células de plantas destinadas a alimentación (Brett y Waldron, 1996; Martín-Cabrejas y col., 2003). A partir de estos resultados se deduce que la celulosa, arabinanos y homogalacturonanos forman los principales polisacáridos de la FI de muestras de judía de Tolosa y lenteja de La Armuña.

Con el objetivo de comparar los diferentes tratamientos y encontrar una relación entre las muestras de leguminosas crudas y procesadas, se analiza la composición en carbohidratos de la FI y se refleja los resultados en forma de un dendrograma (Figura 2.7) (explicado en el Capítulo 1). En consecuencia, se observa que las muestras cocidas se diferencian de las demás muestras, y que por otro lado, las muestras crudas de judía y de lenteja forman un grupo muy similar entre sí. Estos resultados revelan que la composición en carbohidratos de las muestras crudas de judía y de lenteja es muy parecida, y que se diferencian de sus respectivas muestras procesadas. Además, la composición de azúcares de las muestras cocidas difieren del resto, es decir, existe mayor similitud entre la composición de carbohidratos de las muestras crudas y germinadas. Asimismo, independientemente de la condición del procesado, muestras de judía y lenteja presentan composición de FI muy similares entre sí para un mismo tratamiento.



Jcr: judía cruda, Jco: judía cocida, Jge: judía germinada, Lcr: lenteja cruda, Lco: lenteja cocida, Lge: lenteja germinada

Figura 2.7 - Dendrograma de la composición de carbohidratos de la fibra insoluble de leguminosas crudas y procesadas.

Fibra soluble (FS)

Muestras crudas

La composición de los azúcares que constituyen la fracción de FS de las muestras crudas y procesadas de judía de Tolosa y lenteja de La Armuña se muestran en la Tabla 2.3. Es notable la diferencia entre el contenido de carbohidratos totales de las muestras crudas de judía (25 mg/g ms) y de lenteja (3 mg/g ms). Además, los valores obtenidos en judía son similares a la muestra cruda de judía Carilla (22 mg/g ms) (Martín-Cabrejas y col., 2004) y a variedades de soja amarilla y verde (21-42 mg/g ms) (Redondo-Cuenca y col., 2006). De acuerdo con los resultados de azúcares totales de la FS en la muestra cruda de lenteja, presentan valores inferiores a la muestra de lenteja Pardina (14 mg/g ms) (Aguilera, 2009), pero muy próximos a variedades de judía (5 mg/g ms en *Phaseolus angularis* y 4 mg/g ms en *Phaseolus calcaratus*) estudiados previamente por Chau y col. (1998). Estas diferencias en el perfil de la composición de carbohidratos presente en FS de judía y lenteja se deben a la diferente composición de la matriz de la fibra alimentaria.

El estudio detallado de la composición de carbohidratos de la fracción soluble, en el caso de judía cruda, se compone principalmente de arabinosa (47%) y en menor proporción de galactosa, AU y xilosa. Sin embargo, en la muestra cruda de lenteja, los AU parecen ser los mayoritarios (29%), con cantidades importantes de arabinosa (21%). No obstante, es preciso puntualizar que los significativos niveles de manosa, respecto al total de carbohidratos de la FS, corresponden a fructosa, azúcar que fluye cromatográficamente junto a la manosa; ya que según la literatura (Brett y Waldron, 1990) es más probable encontrar niveles muy bajos de manosa en semillas de leguminosas. De esta forma, se puede afirmar que la fracción soluble de la fibra alimentaria en harinas crudas de leguminosas como judía y lenteja está formada principalmente por arabinosa y AU. Hay que enfatizar que en otras leguminosas como el garbanzo Sinaloa son los ácidos urónicos (33%) los que predominan en la FS (Aguilera, 2009), al igual que en guisantes y judías estudiadas previamente (Asp, 1996; Pérez-Hidalgo y col., 1997).

Los resultados revelan que en las muestras de judía, la xilosa representa un importante constituyente de la FS (11%). De acuerdo con la literatura, los altos porcentajes de xilosa se pueden deber a la presencia de xiloglucanos como los principales polisacáridos hemicelulósicos en la pared celular, con frecuencia unidos a otros azúcares, tales como galactosa, fucosa y arabinosa (Redondo-Cuenca y col., 2006). No obstante, en lenteja se observa que la galactosa representa un 17% del total de carbohidratos cuantificados, corroborando los resultados de la bibliografía (Brett y Waldron, 1990).

Tabla 2.3 – Composición de carbohidratos de la fibra soluble de leguminosas crudas y procesadas (mg/g ms).

	Muestra/ Hidrólisis H ₂ SO ₄	Carbohidratos						Total
		Ara	Xil	Man	Gal	Glc	AU	
Judía	Cruda /0,6 M	11,8 ± 0,1 ^a	2,6 ± 0,1 ^a	3,6 ± 0,4 ^b	2,7 ± 0,0 ^a	1,8 ± 0,1 ^b	2,6 ± 1,0 ^a	25,0 ± 0,8 ^a
	%	47,0	10,4	14,3	10,8	7,2	10,4	
	Cocida /0,6 M	16,2 ± 0,3 ^b	3,8 ± 0,1 ^b	2,0 ± 0,1 ^a	2,6 ± 0,3 ^a	1,8 ± 0,1 ^b	9,3 ± 0,1 ^c	35,5 ± 0,0 ^b
	%	45,4	10,6	5,6	7,3	5,0	26,1	
	Geminada /0,6 M	12,9 ± 0,9 ^a	2,7 ± 0,1 ^a	1,3 ± 0,3 ^a	2,0 ± 0,4 ^a	1,3 ± 0,0 ^a	5,4 ± 0,3 ^b	25,5 ± 0,8 ^a
	%	50,4	10,5	5,1	7,8	5,1	21,1	
Lenteja	Cruda /0,6 M	0,6 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,0 ^a	0,5 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,0 ^a	0,8 ± 0,1 ^a	2,7 ± 0,5 ^a
	%	21,4	3,6	14,3	17,9	14,3	28,6	
	Cocida /0,6 M	0,9 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,0 ^a	0,6 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,0 ^a	1,1 ± 0,2 ^a	3,1 ± 0,1 ^a
	%	27,3	3,0	9,1	18,2	9,1	33,3	
	Geminada /0,6 M	0,6 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,0 ^a	1,0 ± 0,1 ^a	2,7 ± 0,2 ^a
	%	20,7	6,9	10,3	13,8	13,8	34,5	

Los valores son medias ± DE, n=3. Las medias dentro de una columna y leguminosa con diferente superíndice son significativamente diferentes para P<0,05.

En cursiva los porcentajes frente al total.

AU: ácidos urónicos, Ara: arabinosa, Xil: xilosa, Man: manosa, Gal: galactosa, Glc: glucosa.

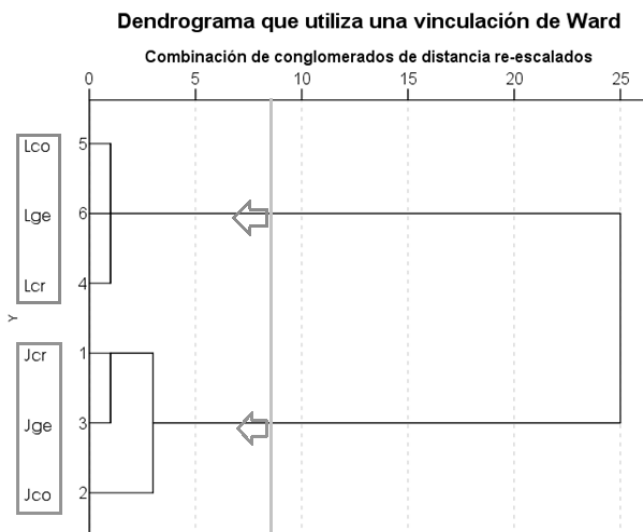
Muestras cocidas

De manera similar a la fracción insoluble, en la FS la composición en carbohidratos revela diferencias entre ambas legumbres procesadas. En el caso de la judía, el proceso de cocción incrementa el contenido total de carbohidratos en un 42%, mientras que en lenteja no se observan diferencias significativas. Este incremento observado en judía, proviene principalmente de un elevado aumento de los niveles de AU y arabinosa. Estos resultados parecen indicar la solubilización de cadenas laterales de arabinanos de la FI como consecuencia del calor aplicado. El enriquecimiento en AU de la FS de judía cocida, unido a su menor contribución en la fracción insoluble de la fibra, hace especular en una solubilización parcial de los polisacáridos pécticos ácidos de la fibra alimentaria cuando la muestra de judía es sometida a un procesamiento térmico. El incremento en el contenido total de carbohidratos de la fracción soluble de la fibra también se apreció en muestras sometidas a cocción y tostado (Asp, 1996; Aguilera, 2009).

Muestras germinadas

El proceso de germinación parece no afectar el contenido total de carbohidratos en ambas leguminosas (Tabla 2.3). Sin embargo, si analizamos la composición detallada de los azúcares se observan ligeras modificaciones en la FS de judía, disminuyendo el contenido de glucosa (28%), mientras que se enriquece en gran medida en AU (107%). Respecto a la lenteja, se observa que los niveles de azúcares no varían en gran medida

en la muestra germinada comparada con la muestra cruda. Asimismo, la mayor parte de la FS de lenteja germinada está compuesta de AU (35%) y arabinosa (21%), y en menor proporción de galactosa y glucosa (14%). Además, de acuerdo con el análisis del dendrograma de la fracción soluble de la fibra (Figura 2.8), la composición de azúcares de las muestras de lenteja se diferencian claramente de las muestras de judía cruda y procesada.



Jcr: judía cruda, Jco: judía cocida, Jge: judía germinada, Lcr: lenteja cruda, Lco: lenteja cocida, Lge: lenteja germinada

Figura 2.8 - Dendrograma de la composición de carbohidratos de la fibra soluble de leguminosas crudas y procesadas.

En general, el contenido de arabinosa, galactosa y ácidos urónicos en ambas leguminosas constituyen más de la mitad de la cantidad total de azúcares, esto significa que los polisacáridos pécticos son los polisacáridos más importantes en la FS en judía y lenteja crudas y procesadas. El análisis de carbohidratos pone de manifiesto los cambios producidos por el calor en la fracción de FS. En este sentido, se observa que el tratamiento térmico provoca un aumento de ácidos urónicos y arabinosa, debido probablemente a su solubilización desde la fracción insoluble de la fibra. Estos hechos se traducen en que el perfil de azúcares de la FS en las muestras cocidas se va enriqueciendo en homogalacturononas y arabinanos, en detrimento de otros polisacáridos pécticos. En estudios anteriores sobre el efecto de los tratamientos térmicos en la fibra, se observó que el calor producía despolimerización, solubilización y degradación de los polisacáridos pécticos (Valiente y col., 1994; Colin-Henrion y col., 2009).

Fibra total (FT)

Muestras crudas

En relación a la composición de carbohidratos presentes en la fibra total, resultante de la suma de sus fracciones (FI + FS) (Tabla 2.4), se han detectado diferencias entre las legumbres estudiadas. Se observa que el total de carbohidratos presentes en la fibra alimentaria de las muestras crudas de judía (195 mg/g ms) es superior a lenteja (141 mg/g ms) siguiendo la misma tendencia observada en la fracción de FI, en que ésta es la fracción con mayor representación en la FT. El resultado observado en judía cruda es similar a judía Carilla (182 mg/g ms) (Martín-Cabrejas y col., 2004) y a lenteja Pardina (183 mg/g ms) (Aguilera, 2009), pero es superior a judía común (150 mg/g ms) estudiada por Martín-Cabrejas y col. (1999). No obstante, judía de Tolosa y lenteja de La Arnuña presentan valores superiores a muestras crudas de otras variedades de leguminosas como judía Mungo (110 mg/g ms) (Gooneratne y col., 1994), guisantes Arvense Esla (117 mg/g ms) (Martín-Cabrejas y col., 2003) y sojas verdes (91 mg/g ms) (Redondo-Cuenca y col., 2006).

Los resultados del análisis enzimático-químico indican que la fibra alimentaria de judía y lenteja crudas está formada principalmente por polisacáridos pécticos y por celulosa. El principal azúcar es la glucosa, seguido de arabinosa y AU, siguiendo la misma tendencia que su fracción insoluble. Los niveles de glucosa de las muestras crudas (71 mg/g ms en judía y 63 mg/g ms en lenteja) son similares a los niveles encontrados en las muestras crudas de judía Carilla (69,7 mg/g ms) (Martín-Cabrejas y col., 2004), pero la lenteja presenta un valor de glucosa inferior al de lenteja Pardina (78 mg/g ms) (Aguilera, 2009).

Tabla 2.4 – Composición de carbohidratos de la fibra total en leguminosas crudas y procesadas (mg/g ms).

	Muestra	Carbohidratos						Lignina	Total
		Ara	Xil	Man	Gal	Glc	AU		
Judía	Cruda	49,0 ± 0,1 ^a	12,3 ± 1,5 ^a	7,3 ± 0,4 ^a	9,5 ± 0,3 ^a	70,9 ± 1,8 ^b	25,3 ± 0,9 ^a	20,8 ± 1,3 ^b	194,9 ± 3,6 ^a
	%	25,1	6,3	3,7	4,9	36,3	13,0	10,7	
	Cocida	48,1 ± 0,3 ^a	10,6 ± 0,1 ^a	6,9 ± 0,6 ^a	9,4 ± 0,4 ^a	87,2 ± 1,3 ^c	24,0 ± 1,3 ^a	12,7 ± 1,0 ^a	198,8 ± 1,6 ^a
	%	24,2	5,3	3,5	4,7	43,8	12,1	6,4	
	Germ.	55,7 ± 1,8 ^b	13,0 ± 0,2 ^a	8,1 ± 0,4 ^a	10,0 ± 0,3 ^a	47,3 ± 1,4 ^a	30,2 ± 2,1 ^b	34,7 ± 0,4 ^c	199,8 ± 2,3 ^a
	%	28,0	6,5	4,1	5,0	23,8	15,2	17,4	
Lenteja	Cruda	24,7 ± 0,3 ^a	10,5 ± 1,0 ^{ab}	2,1 ± 0,2 ^a	6,3 ± 3,0 ^a	63,2 ± 1,1 ^b	24,7 ± 1,3 ^a	9,8 ± 0,0 ^a	141,2 ± 2,1 ^b
	%	17,5	7,4	1,5	4,5	44,7	17,5	6,9	
	Cocida	34,2 ± 0,6 ^b	7,9 ± 1,1 ^a	2,0 ± 0,4 ^a	5,7 ± 0,4 ^a	106,7 ± 4,7 ^c	21,3 ± 1,0 ^a	17,6 ± 1,8 ^b	195,1 ± 4,6 ^c
	%	17,5	4,0	1,0	2,9	54,6	10,9	9,0	
	Germ.	33,3 ± 0,3 ^b	12,9 ± 1,1 ^b	2,3 ± 0,1 ^a	8,2 ± 0,2 ^b	37,4 ± 2,1 ^a	25,3 ± 1,8 ^a	6,7 ± 0,1 ^a	126,0 ± 4,2 ^a
	%	26,4	10,2	1,8	6,5	29,7	20,1	5,3	

Los valores son medias ± DE, n=3. Las medias dentro de una columna y leguminosa con diferente superíndice son significativamente diferentes para P<0,05.

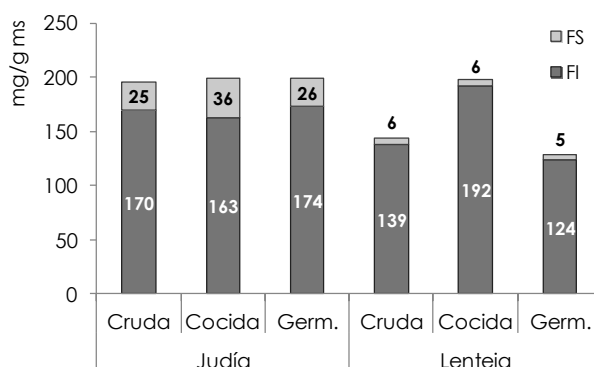
Los resultados expresados como fibra total son la suma entre las dos fracciones de la fibra: Fly FS. Los contenidos de carbohidratos de la fibra insoluble son los valores más altos observados entre las dos hidrólisis (hidrólisis fuerte y hidrólisis suave).

En cursiva los porcentajes frente al total.

AU: ácidos urónicos, Ara: arabinosa, Xil: xilosa, Man: manosa, Gal: galactosa, Glc: glucosa.

Muestras cocidas

En relación a la composición de carbohidratos de la FT, se han detectado diferencias durante los procesos de cocción. La FT sigue un comportamiento muy similar al de FI (fracción mayoritaria) (Figura 2.9), mostrando incrementos de 38% en las harinas cocidas de lenteja, mientras que en judía no se observan diferencias significativas entre las muestras cocida y cruda. El incremento observado en lenteja es debido principalmente al aumento de glucosa (68% de incremento), y en menor grado, a los aumentos de lignina y arabinosa. Aguilera (2009) también observó un aumento en el contenido de azúcares totales, especialmente debido a los niveles de glucosa, como el encontrado en lenteja Pardina cocida (85 mg/g ms), siendo este resultado próximo al observado en el presente trabajo, en la muestra cocida de judía (87 mg/g ms), pero inferior al resultado observado en lenteja cocida (107 mg/g ms) del presente trabajo.



FS: fracción de fibra soluble, FI: fracción de fibra insoluble

Figura 2.9 – Composición de carbohidratos totales de las fracciones de la fibra alimentaria (mg/g ms).

Muestras germinadas

Contrario a la tendencia observada en la cocción, el proceso de germinación provoca una reducción en el contenido total de carbohidratos en lenteja. Este descenso se debe a pérdidas relevantes de niveles de glucosa (41%). Sin embargo, el contenido de arabinosa se incrementa cuando la muestra es procesada, así la lenteja germinada presenta un aumento de 35% en el contenido de arabinosa, mientras que la judía tiene un incremento de 13%, respecto a las muestras crudas. Otros autores también observaron un incremento en el contenido de arabinosa en el caso de judía Carilla fermentada en ácido láctico (19%) (Martín-Cabrejas y col., 2004) y lenteja Pardina sometida a cocción (6%) (Aguilera, 2009). De esta forma, la germinación provoca un incremento en arabinosa, xilosa, galactosa y AU y una disminución del contenido de glucosa en comparación con la muestra control. Esto sugiere la síntesis de polisacáridos, además de la síntesis de nuevas proteínas y RNA mensajero durante la germinación (Abdel-Rehim y col., 1995; Mohamed-Abdel y col., 1995). De acuerdo con la bibliografía, siguiendo las tendencias de las fracciones soluble e insoluble, la FT exhibe un incremento en polisacáridos pépticos como componentes solubles de la pared celular (Martín-Cabrejas y col., 2003) en las muestras procesadas. La cocción, en contraste con la germinación, provoca una reducción en el contenido de xilosa, manosa y AU, y su incremento en el contenido de glucosa se debe principalmente a la presencia de almidón resistente.

Relación AU/AN

Como resultado de la relación entre los monosacáridos, ácidos urónicos/azúcares neutros (AU/AN; donde AN = arabinosa + galactosa) (Tabla 2.5), se observa que la muestra de judía cruda, en todas las fracciones (FI, FS y FT), presenta menores valores en

la relación AU/AN comparada con lenteja cruda, lo que revela un mayor contenido de arabinosa y galactosa que de AU, y que consecuentemente indica una mayor presencia de polisacáridos pécticos muy ramificados en la muestra de judía cruda.

Tabla 2.5 – Relación entre el contenido de ácidos urónicos (AU) y azúcares neutros (AN) de las fracciones de la fibra alimentaria.

		Relación AU/AN		
		FI	FS	FT
Judía	Cruda	0,5	0,2	0,4
	Cocida	0,4	0,5	0,4
	Germinada	0,5	0,4	0,5
Lenteja	Cruda	0,8	0,7	0,8
	Cocida	0,5	0,8	0,5
	Germinada	0,6	1,0	0,6

FI: fibra insoluble, FS: fibra soluble, FT: fibra total

AU/AN: contenido de AU dividido por el contenido de AN (arabinosa + galactosa)

Respecto a la fracción insoluble de la fibra, la cocción produce una reducción del contenido de homogalacturonanos, lo que sugiere la mayor presencia de polisacáridos pécticos ramificados en las muestras cocidas respecto a las muestras crudas, en ambas leguminosas. Lo contrario pasa con la fracción soluble de la fibra, en que se observa un aumento de la relación AU/AN y consecuentemente un aumento de homogalacturonanos, probablemente debido a su solubilización parcial a partir de la fracción insoluble de la fibra.

En general, la germinación provoca aumentos en la relación AU/AN de la FS, incrementando la presencia de homogalacturonanos, mientras que en la FI se observa una mayor presencia de polisacáridos pécticos ramificados, respecto a las muestras crudas, debido una reducción en la relación AU/AN. Por tanto, los polisacáridos son movilizados durante la germinación, proporcionando a la planta cantidades de carbohidratos solubles que pueden ser utilizadas para la formación de otros componentes celulares y para la respiración, produciendo energía (Brett y Waldron, 1996). Conforme a la relación AU/AN de la fracción insoluble, la relación AU/AN de la FT sigue la misma tendencia.

CUANTIFICACIÓN DE ALMIDÓN

La importancia de estudiar el contenido de almidón radica en que representa un componente principal de la composición nutricional de las semillas de leguminosas (40%); concretamente en las muestras empleadas en el presente trabajo constituye entre

26 - 36%. Es, por tanto, una fuente energética directa y que aporta beneficios para la salud, así como propiedades organolépticas y tecnofuncionales favorables en la industria alimentaria (Sridhar y Seena, 2006; Jezierny y col., 2010). En la Tabla 2.6 se observan las diferentes fracciones del almidón: total, disponible y resistente, determinados a partir del residuo insoluble en alcohol (RIA). El contenido total de almidón en las muestras crudas varía entre 291 mg/g ms en judía y 316 mg/g ms en lenteja, resultados que se corresponden con los encontrados en la literatura (Tovar y Melito, 1996; Jood y col., 1998; Frías y col., 2000; Chung y col., 2008). La cantidad de almidón, disponible o asimilable, representa en judía cruda el 87% de la fracción amilácea y en lenteja un 91% (Figura 2.10).

El contenido de almidón resistente en muestras crudas de judía (39 mg/g ms) es similar al valor encontrado de glucosa hidrolizada mediante hidrólisis suave (37 mg/g ms) confirmando que ésta proviene en su totalidad del almidón. Por otra parte, este valor revela que aproximadamente el 55% de la glucosa cuantificada en la fibra alimentaria proviene del almidón resistente, y que éste representa cerca de 20% del total de azúcares de la fibra alimentaria de judía cruda. En el caso de la muestra de lenteja, el nivel de almidón resistente (28 mg/g ms) es similar al contenido de glucosa liberado en hidrólisis suave (33 mg/g ms), lo que esto revela que casi toda la glucosa también extraída en la hidrólisis suave proviene del almidón resistente.

Tabla 2.6 – Composición amilácea de leguminosas crudas y procesadas (mg/g ms).

		Almidón		
Muestra		Total	Disponible	Resistente
Judía	Cruda	291,7 ± 2,8 ^b	253,0 ± 5,4 ^b	38,7
	Cocida	306,6 ± 4,1 ^c	247,3 ± 4,2 ^b	59,4
	Germinada	255,9 ± 5,2 ^a	236,9 ± 4,0 ^a	19,0
Lenteja	Cruda	316,4 ± 3,5 ^a	288,4 ± 3,0 ^a	28,0
	Cocida	361,8 ± 2,8 ^c	320,3 ± 8,1 ^c	41,5
	Germinada	326,7 ± 4,7 ^b	308,6 ± 2,7 ^b	18,1

El proceso térmico puede ocasionar cambios en las características físico-químicas de las leguminosas, debido a las modificaciones que sufren sus componentes, especialmente el componente mayoritario, el almidón. Es conocido que la biodisponibilidad del almidón procedente de los cereales es alta si se compara con el almidón procedente de leguminosas, pues éste es rico en amilosa y bastante resistente debido a su alto poder de cristalización. De este modo, se observa un incremento en la fracción amilácea para

cada una de las leguminosas (5% en judía y 15% en lenteja), cuando las muestras son sometidas al proceso de cocción. Estos incrementos pueden ser debido a un hinchamiento de los granos de almidón, que se quedarían atrapados en la matriz de la fibra y a una pérdida de componentes solubles durante la cocción (Aguilera, 2009). Sin embargo, Aguilera (2009) observó una reducción en los valores de almidón sometidos a cocción en varias leguminosas. Según otros autores (Frías y col., 2000; Pujolá y col., 2007; Rehman y col., 2007) la reducción del contenido de almidón total se debe a la solubilización parcial de la amilopectina y a las diferencias en cuanto al tamaño de la semilla, permeabilidad de membrana y estructura del almidón.

En general, el procesado de las legumbres (remojo, cocción, autoclave...) provoca una mejora de la digestibilidad, debido a la gelatinización de los gránulos de almidón y probablemente a la reducción en el contenido de factores antinutricionales (compuestos fenólicos, inhibidores enzimáticos, fitatos...) en las semillas. De hecho, la eliminación parcial de los taninos y del ácido fítico libera un extenso espacio dentro de la matriz, facilitando el ataque enzimático y como consecuencia mejorando la digestibilidad de la proteína y del almidón después del procesado térmico (Negi y col., 2001; Martín-Cabrejas y col., 2009). No obstante, los efectos del procesado sobre las fracciones de almidón de las leguminosas son bastante controvertidos. Ratnayake y col. (2001), Osorio-Díaz y col. (2003) y Tharanathan y Mahadevamma (2003) verifican que el procesado térmico produce incrementos en los valores del almidón resistente, debidos principalmente a la retrogradación de la amilosa. Sin embargo, Kutos y col. (2003) y Almeida Costa y col. (2006), subrayan que en las muestras crudas el contenido de almidón resistente es casi dos veces mayor que el encontrado en las muestras procesadas. Hoover y Zhou (2003) y Almeida Costa y col. (2006) atribuyen las variaciones en los resultados del almidón resistente a los diferentes métodos de análisis empleados.

El contenido de almidón resistente presente en la muestra cocida de lenteja (42 mg/g ms) es similar al valor de glucosa hidrolizado en condiciones suaves (41 mg/g ms), lo que indica que toda la glucosa solubilizada (21% del total de carbohidratos de la fibra alimentaria de lenteja cocida) proviene de la fracción resistente del almidón. En el caso de la judía, el contenido de almidón resistente (59 mg/g ms) es superior al contenido de glucosa liberado en hidrólisis suave (39 mg/g ms), lo que puede indicar que durante el procesamiento, la fibra se comporta de forma distinta para cada leguminosa, y que en este caso la fibra de judía podría atrapar casi 50% del almidón resistente.

De acuerdo con la Figura 2.10, el almidón disponible representa un 81-94% del almidón total; por lo tanto, el almidón resistente es un componente minoritario lo que se pone de manifiesto de manera más notable en las muestras germinadas ($\pm 9\%$).

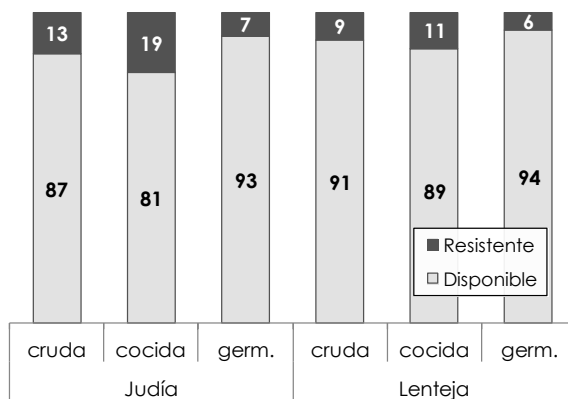


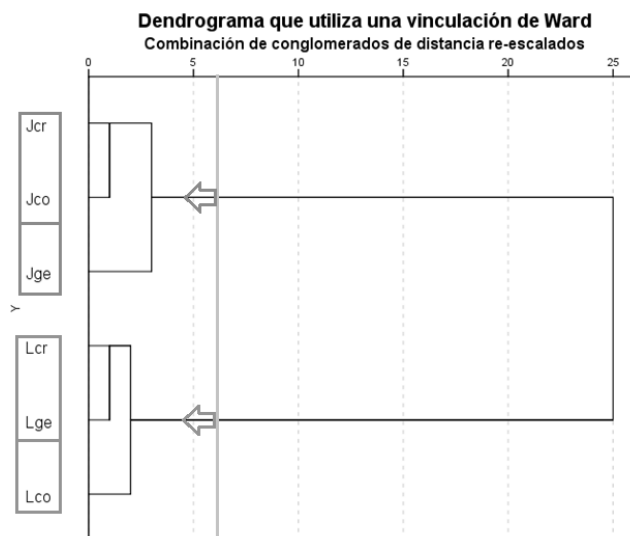
Figura 2.10 – Porcentaje de los componentes de la fracción amilácea (almidón disponible y almidón resistente) de leguminosas crudas y procesadas (%).

Respecto a la germinación, se observa una reducción del almidón total, en el caso de judía disminuye un 12%, mientras que en lenteja los valores en muestras crudas y germinadas son próximos (Tabla 2.6). Sin embargo, los cambios más importantes se producen en la fracción de almidón resistente, donde se aprecian disminuciones de su contenido en las dos leguminosas estudiadas, siendo más notable en el caso de la judía (51% de descenso), mientras que en lenteja la reducción es menos acentuada (36% de descenso).

Las enzimas hidrolíticas que se activan durante la germinación (α -amilasa y β -amilasa) degradan las sustancias de reserva de los cotiledones, entre las que destaca el almidón por su relevancia en el metabolismo energético, ya que proporciona a la semilla la energía suficiente para emprender su crecimiento. Durante este proceso, el almidón va siendo modificado y transformado, lo cual responde a que en un momento determinado de la germinación aumentara el almidón digerible (Mahadevamma y Tharanathan, 2004; Ghavidel y Prakash, 2007). Por lo tanto, con los resultados obtenidos se puede deducir que la germinación mejora la disponibilidad del almidón, de manera que si se requiere como fuente de energía, el proceso de germinación puede ser un buen método para obtenerla.

De acuerdo con el dendrograma que analiza la composición amilácea (Figura 2.11), se observa claramente la formación de dos grupos principales: uno formado por las tres muestras de judía; y otro grupo constituido por las tres muestras de lenteja. Esto significa que la composición en almidón de las muestras de judía es significativamente diferente de las muestras de lenteja. Asimismo, se observa la formación de dos pequeños grupos: (a) judía cruda y judía cocida y (b) lentejas cruda y lenteja germinada, indicando que la

muestra germinada de judía se difiere más de las otras muestras de judía, como también se observa en lenteja cocida con relación a las otras dos muestras de lenteja.



Jcr: judía cruda, Jco: judía cocida, Jge: judía germinada, Lcr: lenteja cruda, Lco: lenteja cocida, Lge: lenteja germinada

Figura 2.11 - Dendrograma de la composición de carbohidratos de la fracción amilácea de leguminosas crudas y procesadas.

2.5 CONCLUSIONES PARCIALES

- ✓ Las harinas de judía de Tolosa y lenteja de La Armuña presentan altos contenidos en fibra alimentaria. Esto indica que ambas leguminosas pueden ser consideradas como fuentes alimenticias de fibra, mostrando la judía un mayor contenido que la lenteja.
- ✓ La composición de la fibra alimentaria revela que la fracción insoluble es la más abundante en ambas leguminosas. Por otro lado, la judía presenta contenidos de fibra soluble notablemente mayores que la lenteja. Los procesamientos, a los que se someten las leguminosas, provocan variaciones en el nivel y composición de la fibra que dependen del procesamiento empleado y del tipo de legumbre estudiada.
- ✓ El contenido en carbohidratos de la fracción insoluble de la fibra es variable en función del tratamiento utilizado. Respecto a la cocción se observa un aumento importante en el contenido de glucosa, aunque se aprecian pérdidas de xilosa y ácidos urónicos, especialmente en las judías. La germinación provoca notables reducciones en los niveles de glucosa, mientras que los de arabinosa aumentan. En consecuencia, la celulosa, arabinanos y homogalacturonanos forman los principales

polisacáridos de la fibra insoluble en las muestras de judía de Tolosa y lenteja de La Armuña.

- ✓ La fracción soluble de la fibra alimentaria en leguminosas crudas y procesadas está formada principalmente por arabinosa y ácidos urónicos. Esto implica que los polisacáridos pécticos son los polisacáridos más importantes en dicha fracción. El perfil de azúcares de la FS en las muestras cocidas se va enriqueciendo en homogalacturonanos y arabinanos, mientras que la germinación no cambia significativamente la composición de los carbohidratos de la fibra soluble, en ambas leguminosas, exceptuando un incremento en los valores de ácidos urónicos.
- ✓ La fibra alimentaria de judía de Tolosa y lenteja de La Armuña está compuesta principalmente por glucosa, arabinosa y ácidos urónicos, de lo que se deduce que la celulosa y los polisacáridos pécticos son los principales constituyentes. La cocción provoca un incremento en el contenido de fibra total, especialmente debido al aumento en los niveles de glucosa. Este hecho podría deberse a modificaciones en las características del almidón, inducidas por el tratamiento térmico, y que quedaría parcialmente incluido en la fracción de fibra alimentaria. Por el contrario, la germinación provoca una notable reducción en el contenido de glucosa, acompañado de un enriquecimiento de la fibra en sustancias pécticas (ácidos urónicos y arabinosa).
- ✓ Por lo que respecta a la fracción de almidón, ambas leguminosas presentan una mayor proporción de almidón en forma disponible, que en forma resistente. El procesamiento afecta de diferente forma la disponibilidad del almidón, destacando un destacado aumento de almidón disponible como consecuencia de la germinación.

"La naturaleza es la madre de todos los habitantes en esta tierra porque es la que nos da el alimento diario, por eso respétala."

Anónimo

Capítulo 3 - INFLUENCIA DEL PROCESAMIENTO SOBRE LA PARED CELULAR DE LEGUMINOSAS

3



Ryan Evangelista dos Santos Abreu

Capítulo 3 - INFLUENCIA DEL PROCESAMIENTO SOBRE LA PARED CELULAR DE LEGUMINOSAS

3.1 RELEVANCIA DEL ESTUDIO

Debido al creciente interés de las diferentes propiedades de la fibra alimentaria, es importante profundizar en el conocimiento de las estructuras de los polisacáridos de la pared celular (PC) y su composición que son, en última instancia, el origen de la fibra alimentaria. La disposición y las interacciones de los polímeros de la pared celular, tanto física como químicamente, determinan en gran medida las propiedades mecánicas de los alimentos.

El aislamiento y la extracción secuencial de polisacáridos de la pared celular dependen de la solubilidad de los diferentes reactivos para separar los distintos polímeros. Este estudio proporciona información sobre la organización de los constituyentes para formar una pared lo suficientemente estable para proteger a la célula (Mateo-Aparicio y col., 2010). Los problemas asociados con el aislamiento y análisis de las paredes celulares surgen principalmente de la preparación del material de la pared celular y del aislamiento de sus componentes.

La pared celular de las plantas tiene una estructura compleja, con propiedades que dependen del tipo de tejido y de la etapa de desarrollo. Las características físicas y las funciones biológicas de la pared celular dependen primeramente de la constitución estructural de los polímeros y de cómo ellos interactúan entre sí para formar la matriz de la pared. El reto es identificar los polisacáridos de la pared celular, glicoproteínas, proteoglicanos y fenoles, y comprender como están reunidos en un tipo específico de célula. En estudios iniciales se utilizó poligatarruronasa por lo que la información sobre la composición y estructura de algunos de los polisacáridos pécticos se vieron perdidos. En trabajos previos se estudió la pared celular del parénquima en diferentes materiales vegetales, sin embargo los polisacáridos pécticos fueron degradados por las condiciones de extracción utilizados. Desde entonces se han desarrollado métodos para mejorar la extracción secuencial de la pared celular que minimicen la degradación de los polisacáridos pécticos y permita un mejor conocimiento de las paredes celulares (Martín-Cabrejas, 1993; Martín-Cabrejas y col., 1994, 2003; Ng y Waldron, 1997; Ng y col., 1998).

El estudio de los componentes de la PC nos permite profundizar en el conocimiento de la fibra alimentaria, en sus propiedades y características funcionales. Con el fraccionamiento secuencial no degradativo de la pared celular se logra un mayor conocimiento de la composición y estructura de los polisacáridos de la pared celular de

leguminosas crudas y sometidas a procesamientos como la cocción y germinación, lo que contribuye a interpretar los procesos químicos, físicos, enzimáticos y fisiológicos que pueden tener lugar.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aplicar un protocolo de fraccionamiento no degradativo que se adecúe para el análisis detallado de los azúcares constituyentes de la fibra alimentaria de leguminosas crudas y procesadas.
- Identificar en las muestras de judía de Tolosa y lenteja de La Armuña los componentes de la pared celular y la forma en que se encuentran unidos, así como estudiar los cambios inducidos por los diferentes procesamientos.

3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

Para el fraccionamiento se utiliza como material de análisis el residuo libre de almidón (RLA). En este fraccionamiento secuencial no degradativo, los polisacáridos de las paredes celulares del RLA se solubilizan secuencialmente mediante extracción con ácido trans-diamino-1,2-ciclohexano-N,N,N',N'- tetracético (CDTA) y carbonato sódico (Na_2CO_3), donde se obtiene un residuo correspondiente al "material despectinizado". Sobre este residuo se efectúan nuevas extracciones en condiciones alcalinas para solubilizar los diversos tipos de hemicelulosas, utilizando para ello hidróxido potásico (KOH) en concentraciones crecientes, 1 M y 4 M. El residuo final que se obtiene está formado fundamentalmente por celulosa, aunque también puede contener cantidades moderadas de otros polisacáridos resistentes a la extracción alcalina. Las metodologías explicadas para la preparación de RLA y del fraccionamiento de la pared celular son una adaptación de los trabajos de Selvendran y Ryden (1990), Ryden y Selvedran (1990a) y Waldron y col. (1995).

PREPARACIÓN DEL RESIDUO LIBRE DE ALMIDÓN (RLA) Y CUANTIFICACIÓN DE SUS COMPONENTES

Los problemas asociados con el aislamiento y análisis de las paredes celulares surgen principalmente de la preparación del material de la pared celular y cuantificación de sus componentes de las paredes. En concreto, en el caso de las leguminosas, el principal problema reside en la eliminación del almidón. En la mayoría de los estudios sobre análisis de la pared celular (Martín-Cabrejas, 1993; Martín-Cabrejas y col., 1994, 2003; Ng y Waldron, 1997; Ng y col., 1998) se utiliza el residuo insoluble en alcohol (RIA), que se prepara mediante inmersión del tejido vegetal en alcohol caliente a 90°C durante 5 minutos. Este procedimiento es adecuado para tejidos relativamente pobres en

proteínas, almidón, ácidos nucleicos, o polifenoles, tales como frutas y verduras. Sin embargo, dicha metodología no se ha empleado en el presente trabajo, ya que se produce co-precipitación de proteínas y el almidón no se solubiliza. En el caso de las leguminosas, como judía y lenteja, con un elevado contenido en almidón, es preciso utilizar otro procedimiento menos degradativo y más eficaz, como ha sido la preparación del Residuo Libre de Almidón (RLA) mediante lavados exhaustivos con dodecilsulfato de sodio (SDS) y agua de las harinas de leguminosas hasta conseguir su completa eliminación. En las muestras que lo precisaron, se realiza una posterior extracción con dimetilsulfóxido (DMSO) para facilitar la solubilización del almidón.

Preparación del RLA

Para la preparación del RLA se siguió el procedimiento que se detalla en la Figura 3.1. Se pesan 25 g de harina de leguminosa, previamente molida, tamizada (0,5 mm) y finalmente molida en molino de bolas. La harina se lava con 250 ml de 1,5% SDS, agitando 30 minutos a temperatura ambiente. El SDS actúa rompiendo enlaces no covalentes en las proteínas, desnaturalizándolas, provocando que estas moléculas proteicas pierdan su conformación nativa.

Posteriormente, se filtra en malla de nylon 100 μ m, lavando con agua destilada (más de 2 litros aproximadamente) hasta eliminar toda la espuma de la muestra. El sobrenadante se descarta y el residuo se lava nuevamente con SDS ahora a 0,5% (250 ml) durante 2 horas en agitación. Se repite la etapa de filtrado y eliminación de espuma, seguido de la realización de la prueba de detección de almidón en el sobrenadante. Para ello se separan 20 ml de sobrenadante procedentes de los lavados del residuo con agua destilada y se añaden 3 gotas de disolución de I_2 en KI al 3%; el almidón en presencia de iodo adquiere coloración azul. Si persiste el color azul significa que aún existe almidón en la muestra, se debe seguir lavando con agua destilada hasta la completa decoloración.

En el presente trabajo fue necesario realizar una posterior extracción con DMSO 90% en muestras crudas y cocidas de judía y lenteja, debido a la gran dificultad que surgió al filtrar dichas muestras en los lavados con SDS. Para ello se extrae el residuo (proveniente del lavado con SDS) con 150 ml de DMSO 90%, se introduce en ultrasonidos la mezcla durante 10 minutos y se agita 16 horas a temperatura ambiente. Se centrifuga a 4000 rpm durante 10 minutos y se descarta el sobrenadante. El residuo se extrae nuevamente con DMSO 90% (100 ml), 30 minutos en ultrasonidos y agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Se centrifuga a 4000 rpm durante 10 minutos, se elimina el sobrenadante, se lava con agua filtrando en malla de nylon 100 μ m, hasta no observar color azul en la prueba con KI (3%). No obstante, en las muestras cocidas no fue posible filtrar el almidón en malla de nylon debido a que los granos amiláceos se encuentran hinchados y

gelificados por el tratamiento térmico. Se observó claramente la separación de una capa blanca constituida por almidón. En este caso el polisacárido se separa por centrifugación y se descarta. El residuo se lava exhaustivamente con agua destilada hasta que la prueba con IK resulte negativa, a partir de donde se obtiene el residuo libre en almidón (RLA).

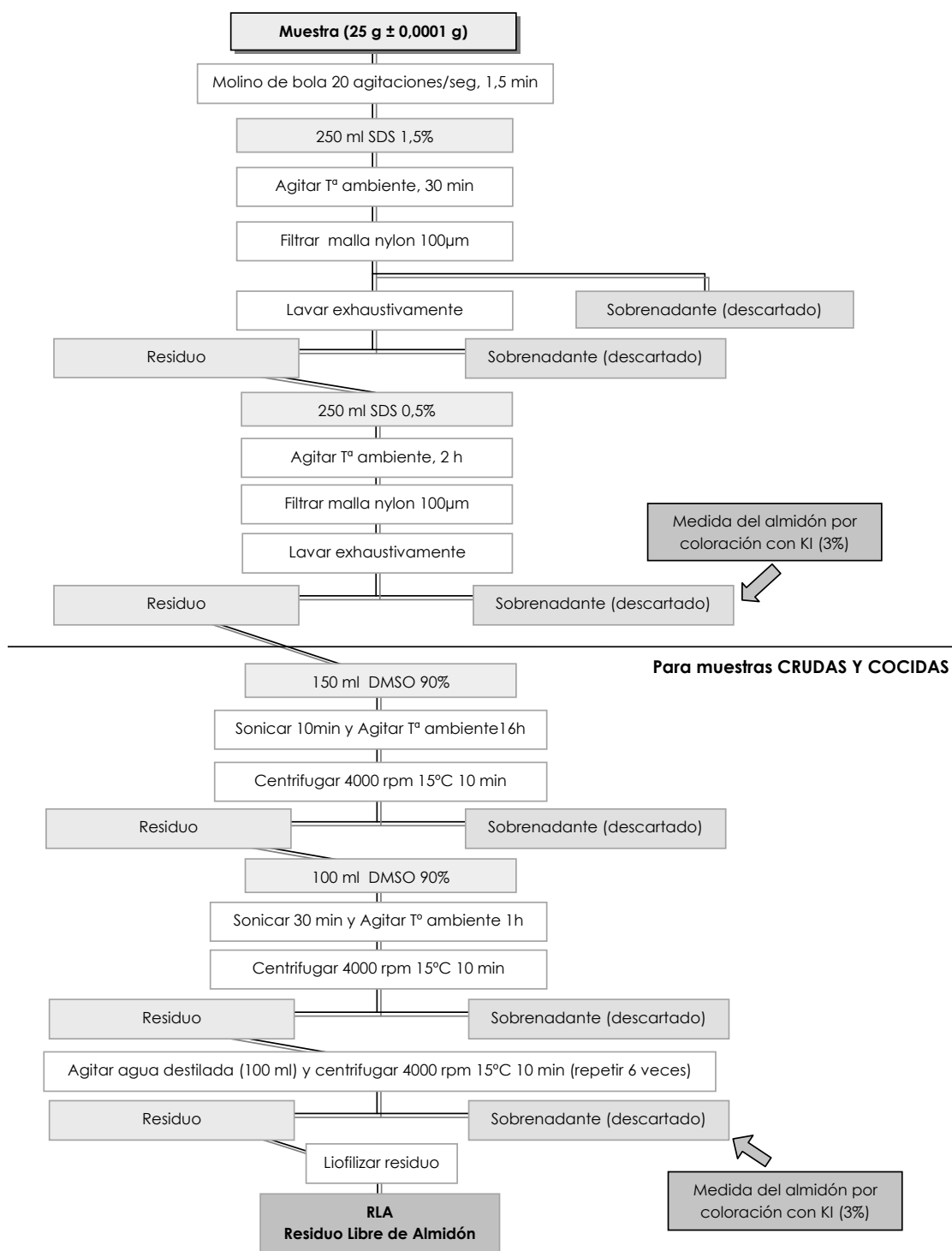


Figura 3.1 – Esquema del método de obtención del Residuo Libre de Almidón (RLA).

En resumen, la extracción de almidón en las muestras germinadas se realiza solamente con SDS y lavados exhaustivos de agua, mientras que en las muestras crudas y cocidas se emplea además el DMSO 90% (Selvedran y Ryden, 1990) para lograr la completa eliminación del almidón y, por tanto, conseguir el RLA (Figura 3.1).

Cuantificación de azúcares neutros y ácidos urónicos

La determinación del contenido de azúcares neutros se realiza a partir de una hidrólisis fuerte (H_2SO_4 12 M) e hidrólisis suave (H_2SO_4 0,6 M), seguida de la cuantificación de los azúcares por HPLC y ácidos urónicos por colorimetría. Todo el método se encuentra detallado en el Capítulo 2 de la presente tesis.

Determinación del grado de metilesterificación del RLA

Para la determinación del grado de metilesterificación de los polisacáridos pécticos (moles metanol/ moles de urónicos) (Ng y Waldron, 1997), la cantidad de metanol y de ácidos urónicos presentes en el residuo libre de almidón (RLA) se determina a partir de 20 miligramos de RLA, a los que se adicionan 2 ml de agua destilada, manteniéndose durante 10 minutos en ultrasonidos. A continuación, se adicionan 0,8 ml de NaOH 2 M, para desesterificar la pectina, se mezcla bien en agitador de tubos durante 10 segundos y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. Se le adiciona 0,8 ml de HCl 2 M, se vuelve a agitar y se coloca en un baño a 25 °C durante 15 minutos. Se centrifuga a 3500 rpm durante 1 minuto y se obtiene el sobrenadante desesterificado.

Para la cuantificación del metanol, 1ml de sobrenadante completamente desesterificado del RLA se le adiciona 1 ml de alcohol-oxidasa (1 unidad/ml, *Pichia pastoris*, Sigma A-2404), se agita en vortex y se incuba a 25 °C por 15 min. Tras la adición de 2 ml de solución de 2,4-pentánodiona 20 mM en acetato de amonio 2 M y ácido acético 50 mM (2 ml de agua en el caso de los blancos), la mezcla es calentada a 58 °C durante 15 minutos y se deja enfriar. A continuación, se mide la absorbancia a 412 nm y se expresa el grado de metilesterificación como moles MeOH/moles ácido galacturónico, utilizando patrones de metanol (0 a 0,624 mM) en tampón fosfato 0,25 M a pH 7,5. Las muestras se prepararon en cuadruplicado (blanco incluido).

FRACCIONAMIENTO DE LOS POLÍMEROS DE LA PARED CELULAR - MÉTODO QUÍMICO NO DEGRADATIVO

Una vez que se obtiene el RLA se procede al fraccionamiento de la pared celular. Trabajos recientes han propuesto métodos de fraccionamiento según la naturaleza y distribución de los polímeros pécticos en las paredes de los tejidos vegetales. En el presente trabajo se utilizan 3 extractantes: CDTA, seguido de Na_2CO_3 (50 mM) y

finalmente, KOH (1 M y 4 M). El proceso conlleva 4 etapas, y produce 5 fracciones de la pared celular (Figura 3.2).

Etapas CDTA

Inicialmente se pesan 2 g de RLA y se añade 200 ml de CDTA + NaCl (0,1 M, pH 6,5). Se agita durante 6 horas a temperatura ambiente. La mezcla se centrifuga a 4500 rpm durante 30 minutos a 20 °C y se filtra con papel de filtro GF/C. El CDTA solubiliza los polímeros que están mantenidos en la pared celular por enlaces cruzados con el calcio. El CDTA quela el calcio en solución; el calcio unido es gradualmente extraído de la pared celular. El objetivo de la extracción con CDTA es solubilizar los polímeros que se hallen unidos a la matriz de la pared celular mediante enlaces con iones Ca^{2+} , es decir, se extrae la fracción de pectinas asociada iónicamente. La proporción de pectinas que se solubiliza mediante CDTA depende de los diversos tipos de tejidos. En el caso de cebollas, judías y patata se extrae el 80% del total del material péctico (Redgwell y Selvendran, 1986; Ng y Waldron, 1997). El sobrenadante producido en cada etapa se reserva para su posterior diálisis.

Etapas Na_2CO_3

Tras la extracción con CDTA, le sigue una extracción con Na_2CO_3 . El residuo de la etapa de CDTA se lava con 200 ml de Na_2CO_3 50 mM + NaBH_4 20 mM durante 20 h en cámara fría (4 °C) y se separa posteriormente el sobrenadante. El Na_2CO_3 es responsable de solubilizar los polímeros que están unidos a la pared celular mediante enlaces muy lábiles, como pueden ser algunos enlaces débiles éster, a la vez que desesterifica los polisacáridos pécticos esterificados con grupos metilo, mientras que el NaBH_4 es un agente reductor que reduce aldehídos y cetonas a alcoholes. En definitiva, en esta fracción se obtienen las pectinas unidas covalentemente. La desesterificación es un aspecto muy importante, ya que las pectinas esterificadas con grupos metilo están expuestas a una degradación por β -eliminación (Waldron y Selvedran, 1990), cuando se hallan en medio alcalino a temperatura ambiente y altas temperaturas, por lo que se realiza la extracción a 4° C durante 20 horas.

La distribución de los azúcares neutros varían entre las fracciones pécticas de acuerdo con muchos factores, incluso la especie vegetal, tipo de tejido, grado de maduración de los tejidos y el método de extracción. Por un lado, el CDTA extrae la pectina unida al calcio, que se consideran la pectina principal de la lamina media, y que son relativamente ricas en ácido galacturónico. Por otro lado, en la extracción posterior con Na_2CO_3 se considera que la pectina extraíble está unida mediante enlaces éster a la pared celular primaria (Shiga y col., 2003).

Etapas KOH

Finalmente se realiza una posterior extracción con álcali (KOH 1 y 4M), cuyo objetivo es solubilizar las hemicelulosas que se pueden extraer a través de la saponificación de los enlaces éster hemicelulósicos que mantienen unidos estos polisacáridos a otros componentes de la pared. Asimismo, puede solubilizar pequeñas cantidades del material péctico entrelazado con hemicelulosas (xiloglucanos y proteoglucanos), aunque las disoluciones alcalinas fuertes solubilizan polisacáridos que están fuertemente asociados con celulosa mediante enlaces de H, tales como xiloglucanos y glucomananos (Martín-Cabrejas, 1993). Por lo tanto, al residuo de la etapa de Na_2CO_3 , se añade 200 ml de KOH 1M + NaBH_4 20 mM; el sobrenadante y el residuo se separan como en las etapas anteriores. La degradación alcalina de hemicelulosas se minimiza reduciendo los grupos aldehído terminales con borohidruro sódico. Se prefiere las disoluciones de KOH a las de NaOH, ya que el acetato potásico que se forma al neutralizar la solución con ácido acético es más soluble, en medio alcohólico, que el acetato sódico. Sin embargo, para solubilizar los glucomananos procedentes de paredes celulares de gimnospermas leñosas se utiliza NaOH como extractante.

En trabajos referidos a hemicelulosas aconsejan la extracción en dos o más etapas, aumentando progresivamente la concentración del álcali. De esta forma se procede a una última extracción con 200 ml de KOH 4M + NaBH_4 20 mM; el sobrenadante y el residuo resultantes se separan como en las etapas anteriores. La efectividad de la extracción de ciertas hemicelulosas (por ejemplo, glucomananos) se ve favorecida por la presencia de borohidruro sódico. El borato forma un complejo con los grupos 2,3-*cis*-hidroxilo de los residuos de D-manosa, haciendo los polímeros más ácidos y, por tanto, más solubles en álcali. Este procedimiento permite aislar xiloglucanos y proteoglicanos de una gran serie de tejidos vegetales (Stevens y Selvendran, 1984; Martín-Cabrejas y col., 1994).

Residuo final

El residuo final denominado α -celulosa, se neutraliza con ácido acético, se filtra en crisol nº 2 y posteriormente se seca en estufa durante 18 horas. Sobre este material se realizan los mismos análisis de composición química que en los extractos de las etapas anteriores.

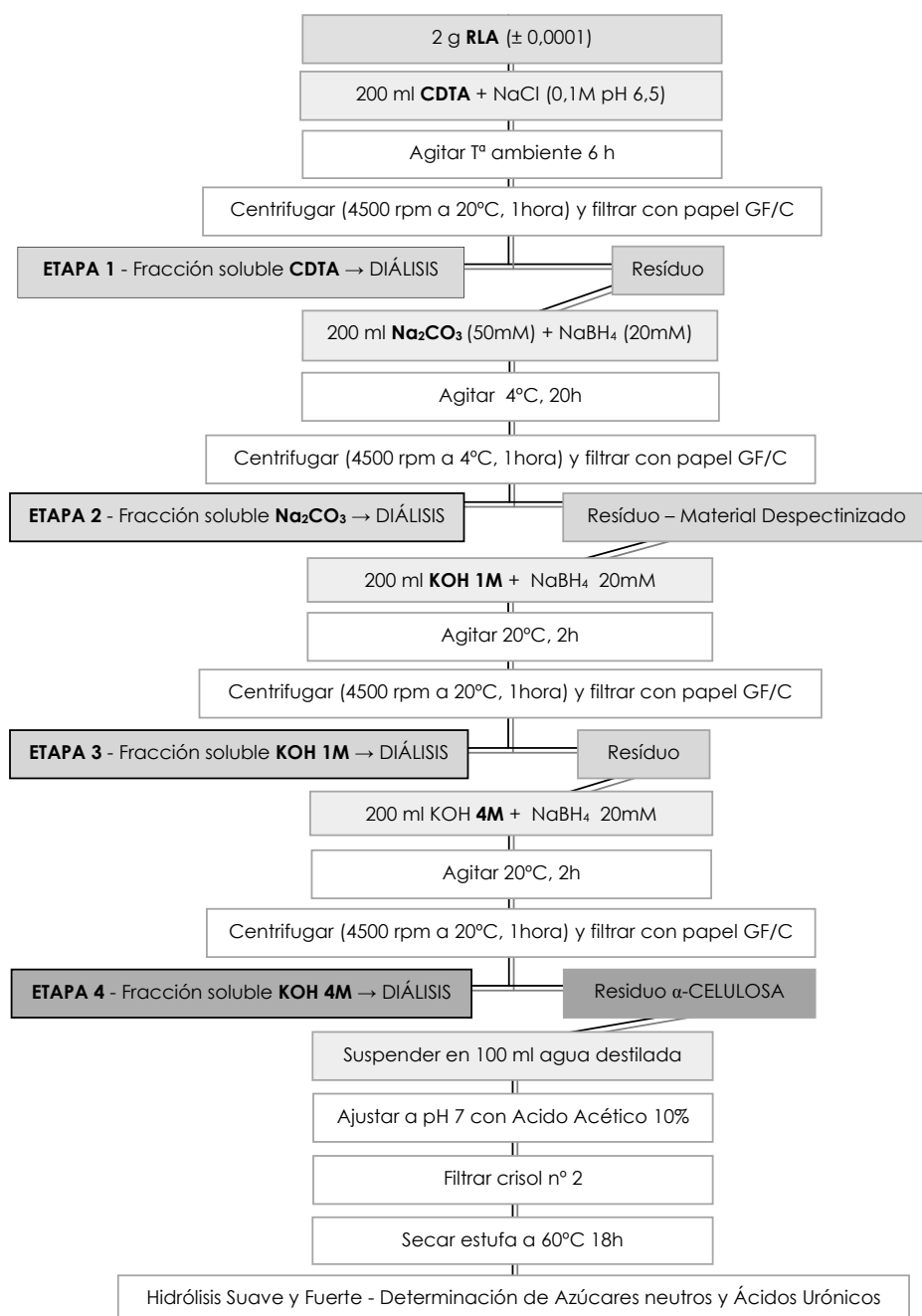


Figura 3.2 – Esquema del fraccionamiento secuencial no degradativo de la pared celular de leguminosas crudas y procesadas.

Diálisis de los sobrenadantes

Todos los extractos procedentes del fraccionamiento secuencial de la pared celular son dializados (Figura 3.3). El proceso de diálisis consiste en introducir los respectivos sobrenadantes de cada una de las etapas en bolsas de diálisis, previamente preparadas. La adecuación de las membranas de diálisis de tamaño de poro de 12.000 - 14.000 kD se realiza hirviendo en agua destilada las membranas de diálisis en forma de bolsas durante 5 minutos, después se retiran y se mantienen en agua destilada a 4 °C hasta su utilización.

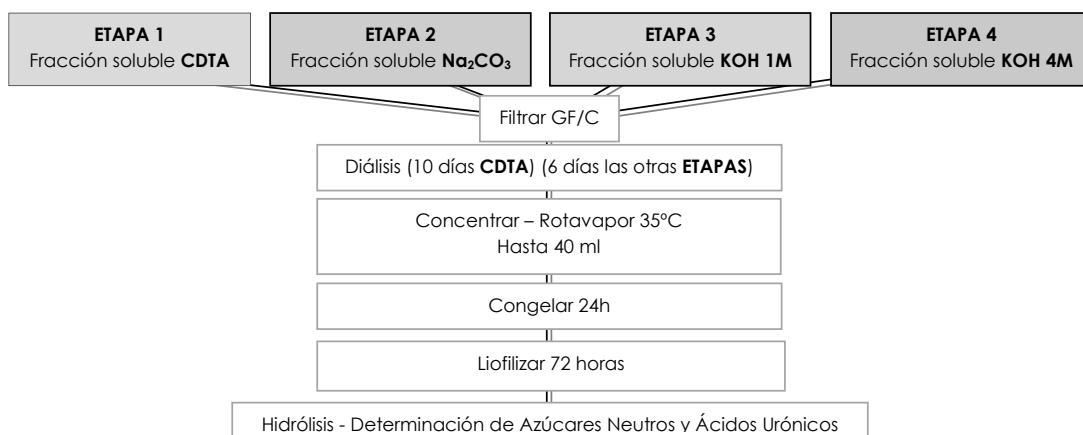


Figura 3.3 – Esquema del proceso de diálisis de los sobrenadantes de las etapas de fraccionamiento secuencial no degradativo de la pared celular.

Las fracciones solubles (sobrenadantes) de cada etapa del procedimiento de extracción se introducen en cada una de las bolsas de diálisis, cerradas con pinzas de plástico, y se realiza la diálisis, colocando dichas bolsas en 5 litros de agua destilada dentro un erlenmeyer, tal como aparece en la Figura 3.4. Se lleva a cabo un cambio de agua por día (5 litros/ día) y la duración del proceso de diálisis es diferente según el extractante utilizado; para CDTA se precisan de 10 días, mientras que las otras etapas se requieren 6 días.

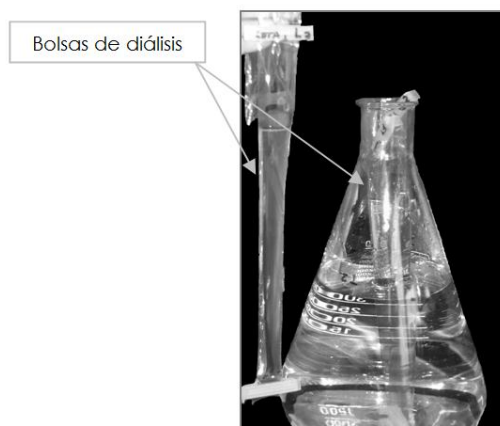


Figura 3.4 – Diálisis utilizando membranas de 12.000-14.000 kD.

El residuo final que permanece tras las extracciones secuenciales (CDTA, Na_2CO_3 y KOH) se denomina α -celulosa, que está formada principalmente por los polisacáridos de celulosa y por cantidades variables de sustancias pécticas altamente ramificadas y glicoproteínas de la pared celular con alto contenido en hidroxiprolina. En la Figura 3.5 aparecen reflejadas las principales características del método de fraccionamiento no degradativo de la pared celular que se ha utilizado en el presente trabajo.

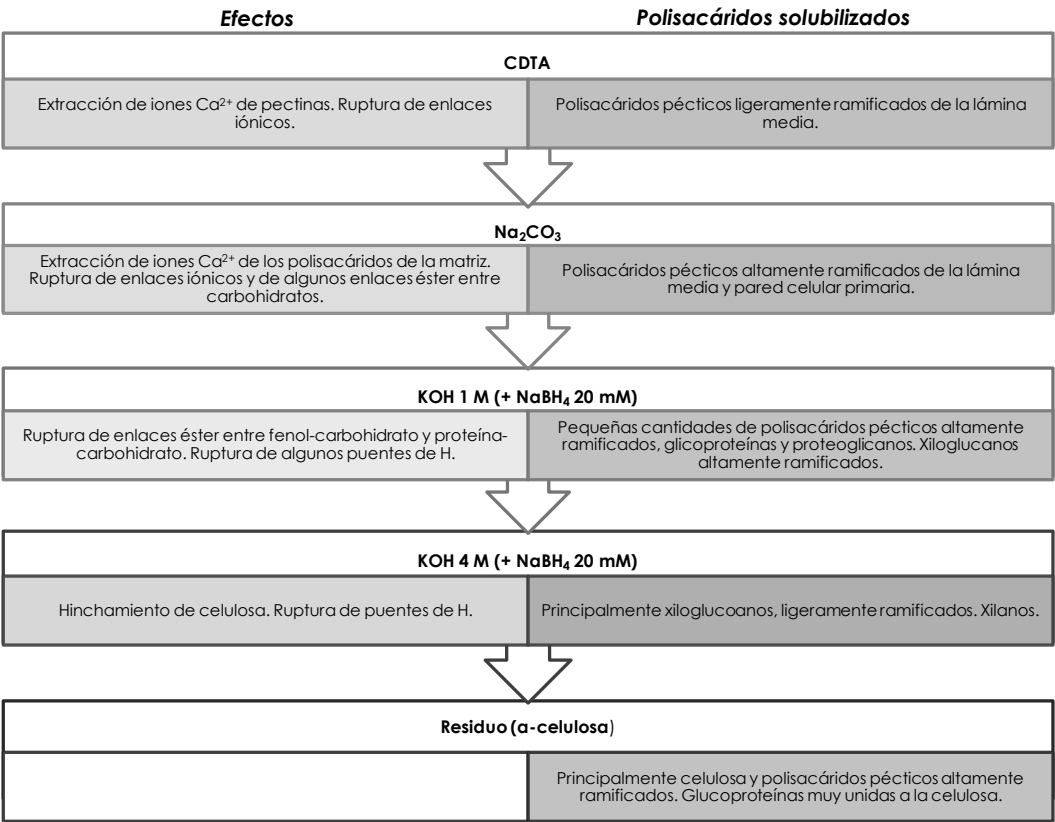


Figura 3.5 – Principales características del método de fraccionamiento secuencial no degradativo de la pared celular.

Cuantificación de los componentes del RLA

Finalmente los sobrenadantes dializados se concentran a un volumen de 40 ml y, junto con el residuo final u α -celulosa, se congelan y liofilizan hasta su posterior cuantificación de azúcares neutros y ácidos urónicos, metodologías que ya han sido descritas en el Capítulo 2.

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIONES

COMPOSICIÓN DEL RESIDUO LIBRE DE ALMIDÓN (RLA)

Para el estudio de las propiedades y características de la fibra es necesario aislarla de otros componentes presentes en la semilla de leguminosas. En este sentido, se hace necesaria la obtención de un material libre de almidón (RLA), ya que este polisacárido es el componente mayoritario en las legumbres objeto de estudio, y por tanto, interfiere en el estudio de la composición de los constituyentes de las paredes celulares.

Rendimiento del RLA

En relación a los rendimientos de RLA en las legumbres crudas y procesadas (Tabla 3.1), se puede observar que la muestra cruda de lenteja (7,5 g/100 g ms) muestra un valor muy superior al de judía (4,3 g/100 g ms). Estos resultados son mayores que los encontrados en el residuo insoluble en alcohol (RIA) en judía común (0,9 g/100 g materia fresca) (Ryden y Selvedran, 1990a) y de judía variedad Horsehead (2,4 g/100 g ms) (Waldron y col., 1995), pero son muy inferiores a los mostrados en el caso de judía variedad Carioca (23 g/100 g ms) (Shiga y col, 2003), de judía variedad Carioca-pérola (17 g/100 g ms) (Shiga y col., 2009), y de un subproducto de soja (74 g/100 g ms) (Mateos-Aparicio y col, 2010). Estas variaciones pueden ser debidas a los distintos métodos de extracción de RIA y del RLA utilizado en el presente trabajo, así como las diferencias en la especie y variedad de leguminosa.

Tabla 3.1 – Rendimiento del residuo libre de almidón (RLA) en relación a materia seca (g RLA/100 g ms), de leguminosas crudas y procesadas.

Muestra	Cruda	Cocida	Germinada
Judía	4,3	1,8	4,2
Lenteja	7,5	2,7	7,5

El proceso de cocción reduce el rendimiento en RLA en aproximadamente 60% en ambas leguminosas. Estos resultados están en concordancia con los de Shiga y col. (2009) que también observaron una reducción en el rendimiento de RIA en judía Carioca-pérola (23%). Los valores obtenidos en muestras cocidas de judía y lenteja son similares a los de RLA de judía Horsehead (1,7 g/100 g ms) (Waldron y col., 1995). Una posible causa del menor rendimiento de RLA en la cocción puede ser debido al difícil proceso de extracción y solubilización del almidón que provoca una pérdida de otros materiales de la pared celular que pueden estar unidos a la fracción amilácea. Por otra parte, se detecta que el proceso de germinación no produce cambios en el rendimiento del RLA, presentando valores iguales a los observados en las muestras crudas en ambas leguminosas.

Composición del residuo libre de almidón (RLA)

Como parte de este estudio, se investiga la composición en carbohidratos de los constituyentes de las paredes celulares (RLA) en cada una de las leguminosas y en los diferentes procesados (cocción y germinación) (Tabla 3.2).

Muestras crudas

Los resultados mostrados en la Tabla 3.2 indican una clara diferencia en el perfil de la composición de carbohidratos presente entre el RLA de judía y lenteja. Se observa que la muestra cruda de judía presenta mayor contenido de carbohidratos totales (949 mg/g RLA) que la muestra cruda de lenteja (921 mg/g RLA). Estos valores son próximos al total de carbohidratos observados en judía de la especie *Phaseolus coccineus* (981 mg/g RLA) (Ryden y Selvendran, 1990a), pero son superiores a judía Carioca (730 mg/g RLA) (Shiga y col., 2004). Al comparar estos resultados con otros tipos de alimentos se observan valores próximos a patata (980 mg/g RLA) (Ryden y Selvendran, 1990b), pero superiores a cebolla entera (828 mg/g RIA) (Ng y col., 1998) y zanahoria cruda (625 mg/g RIA) (Ng y Waldron, 1997).

Tabla 3.2 – Composición de carbohidratos del residuo libre de almidón (RLA) de leguminosas crudas y procesadas (mg/g RLA).

	Muestra/ Hidrólisis H ₂ SO ₄	Carbohidratos						Total (AN + AU)	Lignina Klason	Total*
		Ara	Xil	Man	Gal	Glu	AU			
Judía	Cruda /12 M	188 ± 7^c	75 ± 2^A	nd	23 ± 1^c	355 ± 14^A	119 ± 7^B	759 ± 26^A	51 ± 1^A	949
	0,6 M	307 ± 9 ^c	81 ± 2 ^a	nd	36 ± 4 ^c	242 ± 27 ^b	71 ± 6 ^b	736 ± 43 ^b		
	Cocida /12 M	73 ± 3^A	98 ± 6^B	nd	nd^A	607 ± 12^C	97 ± 15^A	875 ± 26^B	56 ± 3^B	981
	0,6 M	118 ± 9 ^a	76 ± 7 ^a	nd	5 ± 0 ^a	387 ± 14 ^c	31 ± 3 ^a	617 ± 29 ^a		
	Germinada /12 M	146 ± 6^B	104 ± 2^B	nd	18 ± 4^B	449 ± 1^B	153 ± 4^C	869 ± 8^B	109 ± 0^C	998
	0,6 M	160 ± 4 ^b	77 ± 0 ^a	nd	23 ± 0 ^b	83 ± 6 ^a	82 ± 6 ^c	425 ± 8 ^c		
Lenteja	Cruda /12 M	148 ± 8^C	141 ± 4^B	nd	14 ± 2^B	310 ± 4^A	144 ± 5^B	756 ± 6^B	98 ± 3^A	921
	0,6 M	206 ± 2 ^b	119 ± 5 ^b	nd	22 ± 2 ^c	10 ± 0 ^a	56 ± 6 ^b	413 ± 9 ^b		
	Cocida /12 M	40 ± 3^A	173 ± 11^C	nd	nd^A	478 ± 18^B	72 ± 7^A	762 ± 28^B	111 ± 1^B	896
	0,6 M	62 ± 5 ^a	126 ± 5 ^b	nd	nd ^a	261 ± 7 ^c	20 ± 3 ^a	469 ± 12 ^c		
	Germinada /12 M	54 ± 6^B	122 ± 2^A	nd	15 ± 2^B	312 ± 16^A	136 ± 6^B	664 ± 18^A	183 ± 2^C	824
	0,6 M	56 ± 3 ^a	93 ± 4 ^a	nd	9 ± 2 ^b	23 ± 2 ^b	73 ± 1 ^c	252 ± 3 ^a		

Los valores son medias ± DE, n=3. Las medias dentro de una columna y leguminosa con diferente superíndice son significativamente diferentes para P<0,05.

En negrita: hidrólisis fuerte 12 M H₂SO₄, la línea justamente abajo expresa los valores de hidrólisis suave 0,6 M H₂SO₄.

*Total de carbohidratos: suma de los mayores valores observados entre hidrólisis 12 M y 0,6 M.

AN: azúcares neutros, AU: ácidos urónicos, Ara: arabinosa, Xil: xilosa, Man: manosa, Gal: galactosa, Glu: glucosa; nd: no detectada.

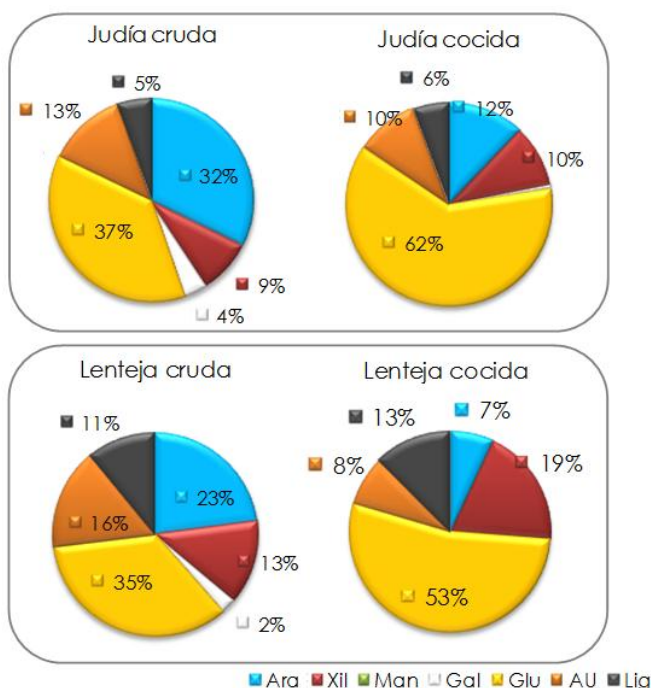
En términos generales, se puede observar en la Figura 3.6, que tanto los RLA de judía como de lenteja en las muestras crudas están formados principalmente por glucosa ($\pm 36\%$), arabinosa ($\pm 27\%$) y ácidos urónicos ($\pm 14\%$), seguido de xilosa, y galactosa, que se encuentran en cantidades inferiores. Es preciso destacar que no se detecta manosa en las muestras estudiadas, como se observa en la literatura (Martín-Cabrejas y col., 2003; Shiga y col., 2003 y 2009). En general, estos resultados están en concordancia con la composición en carbohidratos de RLA de otras leguminosas (Ryden y Selvendran, 1990a; Martín-Cabrejas y col., 2003; Shiva y col., 2003). Comparando con otros alimentos, se observa que en patata cruda (Ryden y Selvendran, 1990b) la glucosa (34%) y galactosa (30%) son los azúcares mayoritarios y en el caso de zanahoria (Ng y Waldron, 1997) la arabinosa solamente representa 7% del total de carbohidratos.

En relación al perfil de azúcares encontrados en RLA de lenteja cruda, se aprecia que el principal azúcar encontrado tras la hidrólisis ácida fuerte (H_2SO_4 12 M) es la glucosa (310 mg/g RLA) mientras que en la hidrólisis suave los niveles de glucosa apenas alcanzan el 10% de la glucosa total. Este hecho indica la baja presencia de almidón resistente en el RLA y que prácticamente la totalidad de la glucosa corresponde al polisacárido de celulosa que se solubiliza en condiciones drásticas (H_2SO_4 12 M). Por lo tanto, estos resultados ponen de manifiesto que el método empleado para la obtención del RLA es el adecuado para la eliminación total del almidón presente en la lenteja cruda. Asimismo, es de destacar la presencia de arabinosa y ácidos urónicos en niveles muy semejantes (146 mg/g RLA) en la hidrólisis fuerte, mientras que en condiciones ácidas suaves (H_2SO_4 0,6 M) la concentración de arabinosa es casi 4 veces mayor que los niveles de ácidos urónicos. Estos valores ponen de manifiesto la naturaleza de los polisacáridos pécticos presentes en el RLA; por una parte, podrían ser galacturonanos (56 mg/g RLA de ácidos urónicos) altamente ramificados con arabinosa y/o arabinanos por los elevados niveles de arabinosa (206 mg/g RLA) que son solubilizados en estas condiciones; y por otra parte, el relevante incremento de ácidos urónicos que se muestra en condiciones de hidrólisis fuerte (144 mg/g RLA) (157% de aumento respecto de la hidrólisis suave), indica la presencia de homogalacturonanos íntimamente enlazados a la celulosa que se solubilizan en condiciones ácidas fuertes (Benítez, 2011).

Por otro lado, es preciso mencionar que la arabinosa de origen péctico sufre importantes descensos (28%) al degradarse en condiciones ácidas fuertes, tal como se muestra en la bibliografía (Martín-Cabrejas y col., 2003, 2004, 2006, 2008). La xilosa, azúcar también de especial relevancia (15%) en el RLA de la lenteja parece mostrar niveles importantes en la hidrólisis suave (84% del total de xilosa) lo que sugiere la presencia de xilanos, hemicelulosas que acompañarían a las sustancias pécticas. No obstante, se destaca un 19% de incremento de xilosa en condiciones ácidas fuertes, indicando que parte de

estas hemicelulosas pueden estar muy unidas a la celulosa puesto que se solubilizan en condiciones ácidas fuertes.

En el caso del RLA de la judía cruda, el perfil de los azúcares es muy similar al de la lenteja, así como su comportamiento frente a las hidrólisis ácidas. La glucosa se presenta también como el azúcar mayoritario en la hidrólisis ácida fuerte (37%), sin embargo, en este caso se observa la presencia de 69% de glucosa en hidrólisis suave (H_2SO_4 0,6 M), lo que indica una importante cantidad de almidón resistente en el RLA. Por lo tanto, se puede concluir que el método de extracción no ha sido tan satisfactorio como en el caso de RLA de la lenteja. La arabinosa es el segundo azúcar mayoritario (32%) seguido de los ácidos urónicos (13%) y en menor medida, la xilosa (9%). Estos valores ponen de manifiesto la diferente naturaleza de los polisacáridos que constituyen el RLA de la judía respecto al RLA de la lenteja; se observa una presencia más relevante de arabinanos ya que la concentración de arabinosa en condiciones suaves es 4 veces superior al de ácidos urónicos. Sin embargo, en condiciones de hidrólisis ácida fuerte se observa un descenso de arabinosa (39%) como consecuencia de la degradación de los polisacáridos pécticos y un incremento de ácidos urónicos (68%), lo que implica la presencia de homogalacturonanos íntimamente enlazados a la celulosa, aunque los niveles no son tan elevados a los mostrados por el RLA en lenteja cruda. En relación a los niveles de xilosa se muestra que éstos son similares en ambas hidrólisis por lo que se concluye que forman parte de xilanos, hemicelulosas que en esta legumbre no se encuentran asociados a la celulosa, sino que se encuentran junto a las sustancias pécticas.



AU: ácidos urónicos, Ara: arabinosa, Xil: xilosa, Man: manosa, Gal: galactosa, Glc: glucosa, Lig: lignina

Figura 3.6 - Composición de azúcares neutros, AU y lignina del RLA de leguminosas crudas y cocidas.

Proceso de cocción

Aunque el perfil de la composición del RLA de judía y lenteja crudas resulta bastante similar, el procesamiento de cocción produce diferencias tanto cualitativas como cuantitativas en los RLA de las leguminosas cocidas (Tabla 3.2 y Figura 3.6). En términos generales, apenas se observan cambios en el contenido total de carbohidratos más lignina; en el caso de lenteja los niveles disminuyen, mientras en judía aumentan ligeramente.

El análisis pormenorizado de cada uno de los RLA obtenidos de las harinas de leguminosas tras el proceso de cocción indica, en lenteja cocida, un aumento del porcentaje de glucosa (del 35 al 53%) y en menor medida de xilosa (de 13 a 19%), mientras que los porcentajes del resto de azúcares disminuyen, siendo esta reducción más acusada en el caso de la arabinosa (de 23 a 7%) y ácidos urónicos (de 16 a 8%), en comparación con la muestra de lenteja cruda. Por tanto, el tratamiento térmico provoca en el RLA de lenteja un enriquecimiento de polisacáridos ricos en glucosa, principalmente de origen celulósico y hemicelulósicos (xilanos y xiloglucanos) junto a una importante solubilización, y por tanto, pérdida de polisacáridos pécticos de tipo arabinanos y arabinogalacturonanos.

Por otra parte, el comportamiento de RLA en muestras de lenteja cocida frente a los diferentes tipos de hidrólisis ácida (H_2SO_4 12 M y 0,6 M) es semejante al observado en las muestras crudas. En este sentido, se destaca el importante contenido de glucosa encontrado tras la hidrólisis suave (54% del total de glucosa), procedente del almidón resistente producido durante el proceso de cocción. Asimismo, se observa el contenido de arabinosa en condiciones suaves que es superior (en 55%) al encontrado en condiciones de hidrólisis ácida fuerte, mientras que los niveles de AU son mayores en condiciones de hidrólisis ácida fuerte (260% frente al valor en HS). Estos resultados ponen de manifiesto que el RLA de muestras cocidas parece estar constituido por arabinanos y/o galacturonanos altamente ramificados con arabinosa junto a homogalacturonanos unidos a la celulosa. Estos datos corroboran la naturaleza de los polisacáridos pécticos presentes en la pared celular de las muestras de lenteja cruda.

En relación al RLA de la judía cocida, se observa que el comportamiento de sus componentes (azúcares neutros y ácidos urónicos) es semejante al de RLA de lenteja cocida, destacándose el significativo incremento de los niveles de glucosa (de 37 a 62%) y descenso de arabinosa (de 32 a 12%) y ácidos urónicos (de 13 a 10%). Por lo tanto, las muestras de judía exhiben un aumento de polisacáridos ricos en glucosa acompañado de una degradación de polisacáridos pécticos de tipo arabinanos y/o arabinogalacturonanos. Asimismo, en condiciones de hidrólisis ácida 0,6 M H_2SO_4 se detecta un alto contenido de glucosa (387 mg/ g RLA) que representa el 64% del total de glucosa lo que significa un elevado contenido de almidón resistente producido durante el proceso de cocción. Por otro lado, se observa que en condiciones suaves el contenido de arabinosa es superior (61%) al encontrado en condiciones de hidrólisis ácida fuerte, mientras que los niveles de ácidos urónicos son 3 veces superiores en condiciones de hidrólisis ácida fuerte. Estos resultados ponen de manifiesto que los polisacáridos que conforman el RLA de muestras cocidas podrían presentar una naturaleza semejante a los de lenteja cocida.

Proceso de germinación

En cuanto al perfil de constituyentes de RLA de harinas de leguminosas germinadas se aprecian diferentes cambios respecto al tipo de leguminosa (Tabla 3.2). En este sentido, se observa un incremento en el contenido de carbohidratos totales en judía (5%), mientras en la muestra germinada de lenteja se aprecia una significativa reducción (10%). El incremento observado en el caso de judía germinada es debido a un aumento en el contenido de lignina (113%), xilosa (30%), glucosa (26%) y AU (29%), compensado por una disminución de los niveles de arabinosa (48%).

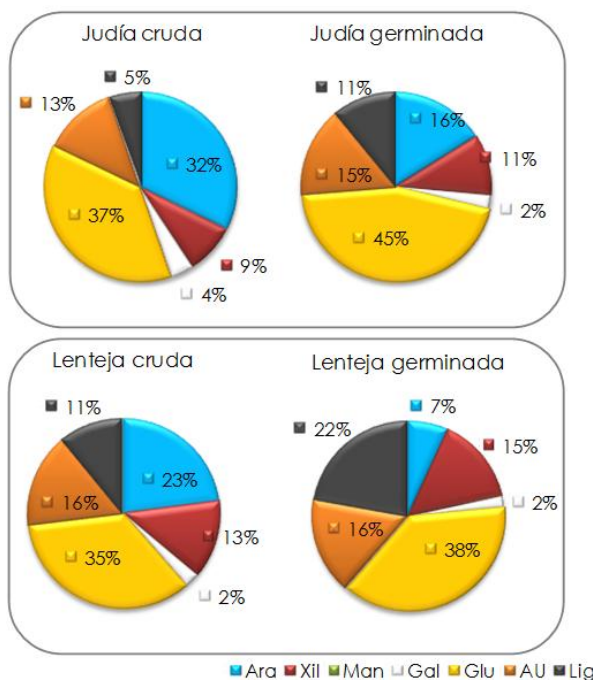
Las modificaciones producidas durante la germinación de las judías se pueden detallar con más profundidad comparando los resultados entre ambas hidrólisis ácidas. El principal azúcar encontrado tras la hidrólisis ácida fuerte (H_2SO_4 12 M), sigue siendo la glucosa (449 mg/g RLA) mientras que en la hidrólisis suave los niveles de glucosa alcanzan 18% de la glucosa total, lo que pone de manifiesto la presencia de celulosa como componente mayoritario. Asimismo, en la hidrólisis fuerte, es de destacar la presencia de ácidos urónicos y arabinosa en niveles muy semejantes (153 y 146 mg/g RLA, respectivamente), mientras que en condiciones suaves la concentración de arabinosa se mantiene, siendo la concentración de ácidos urónicos menor (54% del total). Estos resultados ponen de manifiesto la distinta naturaleza de los polisacáridos pécticos presentes en el RLA: en condiciones suaves se solubilizarían galacturonanos (82 mg/g RLA de ácidos urónicos) altamente ramificados con arabinosa y/o arabinanos por los mayores niveles de arabinosa (160 mg/g RLA); y, en condiciones de hidrólisis fuerte se muestra el relevante incremento de ácidos urónicos (87%), sugiriendo la presencia de homogalacturonanos íntimamente enlazados a la celulosa que se solubilizan en condiciones ácidas fuertes. Finalmente, la xilosa que muestra niveles significativos en la hidrólisis suave (77 mg/g RLA) presenta un incremento en sus niveles cuando se trata de la hidrólisis fuerte (35% respecto al contenido de xilosa en condiciones suaves), lo que pone de manifiesto la presencia de xilanos y/o xiloglucanos, hemicelulosas que pueden estar muy unidas a la celulosa puesto que se solubilizan en condiciones ácidas fuertes. Este comportamiento de la xilosa es diferente al mostrado en el RLA de judía cruda, por tanto, indica los cambios químicos que tienen lugar durante la germinación.

Por otra parte, si analizamos los cambios producidos de manera porcentual en los constituyentes de RLA de judía germinada, comparando con el RLA de muestra cruda (Figura 3.7), se corroboran los datos anteriores; la germinación provoca un aumento del porcentaje de glucosa en el RLA (de 37% a 45%) junto a los ácidos urónicos (de 13% a 15%) mientras que los porcentajes de la arabinosa descienden de manera drástica (de 32% a 16%). Por tanto, el proceso de germinación en judías provoca en el RLA un enriquecimiento de polisacáridos ricos en glucosa, principalmente de origen celulósico junto a una importante solubilización de polisacáridos pécticos tipo arabinanos, mientras que parecen incrementarse los polisacáridos pécticos de tipo homogalacturonanos. Asimismo, se destaca el incremento de lignina Klason observado durante la germinación (de 5% a 11%), este hecho puede ser debido a la formación de metabolitos secundarios que son insolubles en condiciones ácidas como componentes de Maillard (Marlett y Vollendorf, 1993).

En general, los resultados obtenidos en judía germinada son similares a los encontrados de Martín-Cabrejas y col. (2003) en otras leguminosas, que observaron un incremento en

carbohidratos totales de 18% en muestras de guisantes germinadas en la luz, apreciando un aumento aun mayor en muestras germinadas en la oscuridad (68%).

En el caso del RLA de la lenteja germinada, se observa un descenso generalizado de todos y cada uno de los azúcares, excepto de la glucosa respecto al RLA de lenteja cruda, destacando las reducciones en arabinosa (72% de reducción), xilosa (13%) y, en menor proporción, de AU (6%), en cambio los niveles de lignina se incrementan notablemente (87%). La glucosa se presenta también como el azúcar mayoritario en la hidrólisis ácida fuerte (38%), seguido de los ácidos urónicos (17%), la xilosa (15%) y en menor medida, la arabinosa (7%). La comparación entre las hidrólisis H_2SO_4 12 y 0,6 M nos pone de manifiesto que la presencia de celulosa como componente mayoritario ya que apenas se observan contenidos destacables en la hidrólisis suave. Por otro lado, se destaca la concentración de arabinosa que es ligeramente inferior a la de ácidos urónicos en la hidrólisis suave lo que sugiere la solubilización de polisacáridos pécticos de tipo homogalacturonanos (73 mg/g RLA de ácidos urónicos). Sin embargo, en condiciones ácidas fuertes se observa un nivel semejante de arabinosa y un incremento de ácidos urónicos (86% de incremento) que implica la presencia de galacturonanos altamente ramificados con arabinosa íntimamente enlazados a la celulosa. En relación a los niveles de xilosa, éstos son superiores en la hidrólisis fuerte (31%) por lo que parte de este azúcar podría formar parte de xilanos y/ xiloglucanos, asociados a la celulosa, aunque la mayoría de hemicelulosas que contiene xilosa se encuentran formando parte junto a las sustancias pécticas (Martín-Cabrejas y col., 2006; Aguilera, 2009; Benítez, 2011). Asimismo, es preciso destacar el incremento de lignina Klason observado durante la germinación (de 10% a 22%), como consecuencia de la formación de metabolitos secundarios que son insolubles en condiciones ácidas.



AU: ácidos urónicos, Ara: arabinosa, Xil: xilosa, Man: manosa, Gal: galactosa, Glc: glucosa, Lig: lignina

Figura 3.7 - Composición en azúcares neutros, AU y lignina del RLA de leguminosas crudas y germinadas.

A la vista de los resultados se puede indicar que en los RLA de las leguminosas crudas y procesadas se aprecia una menor presencia de polisacáridos pécticos ramificados, lo que se deduce por la mayor relación AU/AN (ácidos urónicos / azúcares neutros Ara+Gal) que presenta (Tabla 3.3). Se observa que la relación AU/AN es superior en las muestras de lenteja que en judía, mientras que los procesamientos tanto de cocción como de germinación incrementan esta relación en ambas leguminosas. Este aumento puede indicar una mayor contribución de los homogalacturonanos en comparación con el RLA de muestras crudas, sugiriendo que los polisacáridos pécticos de muestras procesadas son menos ramificados que en las muestras crudas, lo que podría afectar a las propiedades funcionales de estas harinas de semillas de lentejas sometidas a cocción o germinación.

Tabla 3.3 – Relación entre el contenido de ácidos urónicos (AU) y de azúcares neutros (AN = Gal + Ara) del RLA de leguminosas crudas y procesadas.

Muestra	Relación AU/AN		
	Cruda	Cocida	Germinada
Judía	0,3	0,8	0,8
Lenteja	0,6	1,2	1,9

Asimismo, hay que destacar diferencias en la naturaleza de las sustancias pécticas de las leguminosas procesadas, donde se observa una menor presencia de polisacáridos pécticos ramificados producido principalmente por la pérdida de arabinosa, lo que se deduce por la mayor relación AU/AN que presentan. Estos hechos se deben probablemente a la solubilización de materiales durante la cocción o a los cambios fisiológicos provocados por la germinación en la semilla de las leguminosas, lo que origina cambios en el contenido y composición de RLA.

A la vista de estos resultados se puede afirmar que los procesamientos tanto de cocción como de germinación afectan significativamente a la composición de carbohidratos de la pared celular y que cada leguminosa presenta características propias en relación a su pared celular.

Estudio del grado de metilesterificación (GM) de los polisacáridos pécticos

Debido al gran interés que suscitan las sustancias pécticas por parte de la industria alimentaria, se llevó a cabo el análisis del grado de metilesterificación en los RLA de las leguminosas objeto de estudio con el fin de un conocimiento más específico de las mismas. En las frutas, por ejemplo, la mayoría de los grupos ácidos del ácido galacturónico están esterificados por metanol. Este metanol puede perderse con relativa facilidad por hidrólisis ácida o enzimática, dejando el grupo ácido libre. En función del porcentaje de restos de ácido galacturónico esterificado, las pectinas se clasifican como "de alto metoxilo", cuando este porcentaje es superior al 50%, y "de bajo metoxilo", cuando es inferior. Los resultados obtenidos (Tabla 3.4) muestran que el grado de metilesterificación de RLA de judía cruda (24%) es superior a lenteja cruda (18%). Estos valores son próximos a RLA de soja (25%) (Koch y col., 1999) superiores a RLA de cáscara de garbanzos (12%) (Weightman y col., 1995), sin embargo son inferiores a RLA de zanahoria fresca (63%) (Ng y Waldron, 1997). Un estudio comparativo del grado de metilesterificación de tomates con diferentes coloraciones (variedades), reveló que la

muestra verde madura presenta GM de 65%, mientras que el tomate rojo maduro presenta valor cerca a 25%. El grado de metilesterificación de la pectina juega un papel regulatorio importante en la extensión de la despolimerización de la pectina (Wakabayashi y col., 2003).

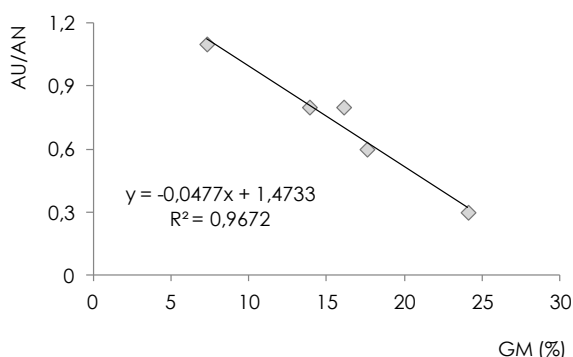
Tabla 3.4 – Grado de Metilesterificación (%) del RLA de leguminosas crudas y procesadas.

Muestra	Judía	Lenteja
Cruda	24,1 ± 1,7 ^c	17,6 ± 0,5 ^c
Cocida	13,9 ± 2,2 ^a	7,3 ± 0,7 ^a
Germinada	16,1 ± 0,4 ^b	14,6 ± 1,3 ^b

Los valores son medias ± DE, n=3. Las medias dentro de una columna y leguminosa con diferente superíndice son significativamente diferentes para $p < 0,05$. Grado de metilesterificación = (mmol ac. galacturónico / mmol MeOH) x 100.

Los procesamientos, tanto de cocción como de germinación, afectan significativamente la esterificación de los polisacáridos pécticos del RLA. La cocción provoca reducciones importantes en el grado de metilesterificación en judía (42%) y en lenteja (59%). Mientras que las reducciones observadas en la germinación son inferiores, siendo más acentuada en judía germinada (33%) que en lenteja (17%). Los cambios observados en el grado de metilesterificación de los polisacáridos pécticos provocan diferencias significativas en las características tecno-funcionales, como por ejemplo en la capacidad de retención de agua que será más alta cuanto más esterificada se encuentren las pectinas de la fibra. Asimismo, la desesterificación de las pectinas y el incremento de la concentración de ácido galacturónico pueden dar lugar a un incremento en la capacidad de intercambio iónico (Weighman y col., 1995).

En general, el contenido total de ácidos urónicos (AU) refleja el contenido en pectinas en el material vegetal y la relación AU/azúcares neutros (AN = arabinosa + galactosa) nos indica el nivel de ramificación que presentan las pectinas, cuanto menor es dicha relación más ramificados son los polisacáridos pécticos presentes en la matriz vegetal. En el presente trabajo, se ha correlacionado la relación AU/AN de los RLA con el grado de metilesterificación que presentan, observándose una alta relación indirecta entre ellos ($r = -0,98$ $P < 0,01$) (Figura 3.8).



AU: ácidos urónicos, AN: azúcares neutros, GM: grado de metilesterificación

Figura 3.8 – Correlación entre AU/AN y el grado de metilesterificación (GM %) del RLA de muestras crudas y cocidas de leguminosas.

Estos resultados confirman que cuanto menor sea la relación de AU/AN más ramificado es el polisacárido péctico, y además, en este caso más esterificado se encuentra.

FRACCIONAMIENTO SECUENCIAL NO DEGRADATIVO DEL MATERIAL DE LA PARED CELULAR

Composición de la pared celular

El RLA es sometido a un fraccionamiento secuencial no degradativo basado en el método Waldron y col. (1995) y Ryden y Selvendran (1990a). El procedimiento está diseñado para minimizar la posible degradación de los polímeros pécticos (Waldron y Selvendran, 1992). En la Figura 3.9 se muestran los porcentajes de los pesos obtenidos en cada fracción. Entre las muestras crudas se observa que en judía la fracción que tiene mayor representación es el residuo (α -celulosa) (72%), seguida del conjunto de las fracciones de KOH (14%) y Na_2CO_3 (9%), siendo la fracción minoritaria la extraída por CDTA (6%). De forma similar, en lenteja cruda se observa la misma tendencia que en judía, aunque en distinta magnitud, ya que, el residuo final de celulosa tiene menor representatividad (39%) dentro del total extraído comparado con el de judía, y se extrae mayor cantidad de material en las fracciones de KOH y de Na_2CO_3 .

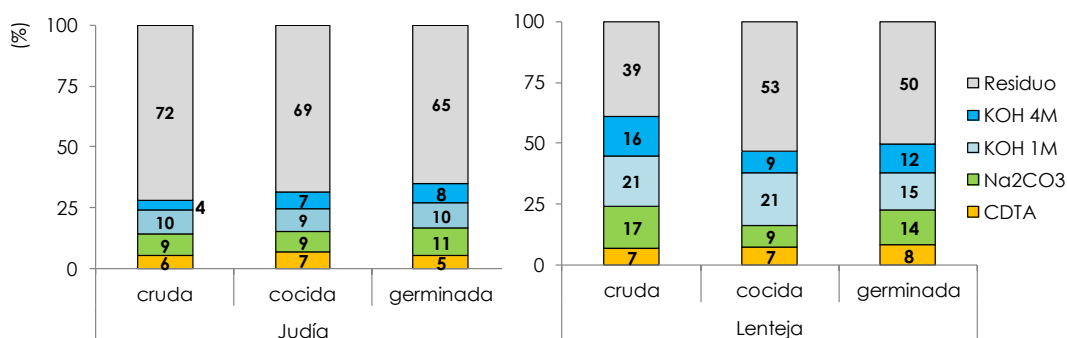


Figura 3.9 – Composición de la pared celular según las etapas del fraccionamiento secuencial no degradativo (%) de leguminosas crudas procesadas.

La cocción provoca cambios discretos en la muestra de judía, donde se aprecia una pérdida en los niveles de α -celulosa o residuo (de 72% a 69%), mientras que se observan ligeros incrementos en los valores de KOH (de 14% a 16%). Sin embargo, en el fraccionamiento de la lenteja cocida se observa un importante incremento en los niveles de residuo (de 39% a 53%), mientras que disminuyen las fracciones de Na₂CO₃ (de 17% a 9%) y KOH (de 37% a 30%) en comparación con las muestras crudas. Por tanto, la cocción provoca cambios en la composición de la pared celular de leguminosas, que depende a su vez de la muestra de legumbre estudiada, siendo estos cambios más acusados en la muestra de lenteja.

En relación a las muestras germinadas, se aprecia en judía una disminución de los niveles del residuo (de 72% a 65%), compensados por aumentos en las fracciones de Na₂CO₃ (de 9% a 11%) y de KOH (de 14% a 18%). En lenteja germinada aumentan los valores de residuo (de 39% a 50%), mientras que disminuyen las fracciones de Na₂CO₃ (de 17% a 14%) y KOH (de 37% a 27%). De esta forma se puede concluir que las muestras de judía y lenteja germinadas se comportan de forma contraria, por un lado en judía germinada se observan incrementos en hemicelulosas y pectinas y pérdidas de celulosa, y por otro lado en lenteja se aprecian incrementos en celulosa y pérdidas de hemicelulosas y pectinas.

En general, las muestras de judía de Tolosa y lenteja de la Arnuña crudas y procesadas tienen el residuo (α -celulosa) como fracción mayoritaria, seguido de las fracciones de KOH y Na₂CO₃, y por último, la fracción de CDTA como la menos representativa. Asimismo, se observa que entre las dos fracciones de KOH, la que tiene mayor porcentaje en peso es la KOH 1M.

Fracción CDTA

Este procedimiento de extracción fraccionada secuencial reduce la degradación por β -eliminación de las pectinas durante las etapas iniciales de dicha extracción. De esta forma, se consigue la solubilización de los polisacáridos del modo más aproximado a su forma nativa (Martín-Cabrejas, 1993). El conocimiento de la naturaleza química del medio de extracción permite llegar a establecer algunas características de los polisacáridos que se solubilizan en dicho medio. En las disoluciones del agente quelante CDTA se extraen polisacáridos que presentan puentes de Ca^{2+} y otros enlaces iónicos, como es el caso de los polisacáridos pécticos de la lámina media.

Contenido de material celular en CDTA

El tratamiento del RLA con CDTA hace posible la separación fraccionada de los polisacáridos pécticos y la obtención de un material parcialmente libre de los mismos. En este caso es más interesante comparar los resultados con respecto al RLA, de esta forma se evita la interferencia del rendimiento de cada residuo libre de almidón. A la vista de los resultados (Figura 3.9) la fracción extraída con CDTA representa un 5,6 - 6,9 % RLA, en las muestras crudas de judía y lenteja, respectivamente.

Con respecto a las muestras procesadas, se observa que la cocción apenas influye sobre la proporción de material extraído por CDTA tanto en judía como en lenteja. La germinación, por otro lado, provoca modificaciones de diferente tipo en cada una de las legumbres. En judía germinada, apenas se observan cambios respecto a la muestra cruda, mientras que en lenteja germinada se nota un ligero incremento (de 6% a 8%) en el porcentaje de la fracción extraída por CDTA.

Por lo tanto, los polisacáridos pécticos extraídos por CDTA, que se unen a la pared celular por enlaces Ca^{2+} y que componen la lámina media, tienen una contribución minoritaria a las paredes celulares, es decir, al RLA, donde representan menos de 8% del total de los componentes del residuo libre de almidón de judía de Tolosa y lenteja de la Armuña, tanto crudas como procesadas.

Composición de carbohidratos de la fracción CDTA

Los resultados mostrados en la Tabla 3.5 corresponden al contenido de carbohidratos determinados en la fracción extraída por CDTA. En las muestras crudas se aprecia que la fracción CDTA en judía presenta mayor contenido de azúcares (11,4 mg/g RLA) que en lenteja (2,6 mg/g RLA). Estos valores son inferiores a muestras judía Carioca (Shiga y col., 2003) y judía *P. coccineus* (Ryden y Selvendran, 1990a). Las discrepancias encontradas

entre el presente trabajo y otros estudios pueden ser debidas a la diferencia entre la metodología empleada.

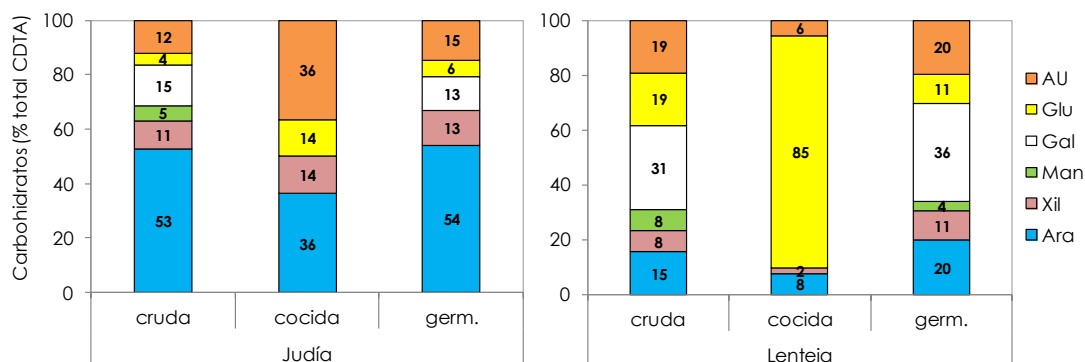
Tabla 3.5 – Composición en carbohidratos de la fracción extraída por CDTA de leguminosas crudas y procesadas (mg/g RLA).

CDTA		Azúcares Neutros							
	Muestra/ Hidrolisis H ₂ SO ₄							Total	AU/AN
		Ara	Xil	Man	Gal	Glu	AU		
Judía	Cruda (0,6 M)	6,0 ± 0,3 ^c	1,2 ± 0,1 ^c	0,6 ± 0,1	1,7 ± 0,2	0,5 ± 0,0 ^b	1,4 ± 0,1 ^b	11,4	0,1
	Cocida (0,6 M)	0,8 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,0 ^a	nd	nd	0,3 ± 0,1 ^a	0,8 ± 0,1 ^a	2,2	1,0
	Germinada (0,6 M)	2,6 ± 0,1 ^b	0,6 ± 0,0 ^b	nd	0,6 ± 0,1	0,3 ± 0,0 ^a	0,7 ± 0,0 ^a	4,8	0,2
Lenteja	Cruda (0,6 M)	0,4 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,5 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,0 ^b	2,6	0,4
	Cocida (0,6 M)	0,4 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a	nd	nd	4,5 ± 0,2 ^b	0,3 ± 0,0 ^a	5,3	0,8
	Germinada (0,6 M)	1,1 ± 0,0 ^b	0,6 ± 0,01 ^c	nd	2,0 ± 0,2	0,6 ± 0,0 ^a	1,1 ± 0,0 ^c	5,4	0,4

Los valores son medias ± DE, n=3. Las medias dentro de una columna y leguminosa con diferente superíndice son significativamente diferentes para P<0,05.

AN: azúcares neutros, AU: ácidos urónicos, Ara: arabinosa, Xil: xilosa, Man: manosa, Gal: galactosa, Glu: glucosa. AU/AN: donde AN = Ara + Gal. nd: no detectada.

La composición en carbohidratos de las muestras crudas de judía y lenteja muestran claras diferencias entre sí (Figura 3.10). En la fracción extraída con CDTA en la muestra de judía, se aprecia que el azúcar principal es la arabinosa (53% del total de carbohidratos de la fracción), seguido de la galactosa (15%), xilosa y ácidos urónicos (± 11% cada uno) y, en menor proporción, glucosa (4%). Sin embargo, la fracción de CDTA en lenteja cruda presenta la galactosa (31%) como azúcar mayoritario, seguido de glucosa y AU (19% cada), arabinosa (15%) y en menor proporción xilosa (8%). Estos resultados son similares a los indicados en la literatura (Shiga y col., 2003, 2009) y ponen de manifiesto que la fracción de CDTA extrae principalmente polisacáridos pécticos, aunque de distinta naturaleza en judía y en lenteja.



AU: ácidos urónicos, Ara: arabinosa, Xil: xilosa, Man: manosa, Gal: galactosa, Glu: glucosa

Figura 3.10 – Porcentaje de azúcares neutros y ácidos urónicos que componen la fracción de CDTA de leguminosas crudas y procesadas.

Con respecto a la cocción, se observa en la muestra de judía (Tabla 3.5 y Figura 3.10) que el total de carbohidratos extraídos en la fracción de CDTA disminuye notablemente (81%), principalmente debido a pérdidas de galactosa, arabinosa, xilosa y AU, resultados que son similares a los observados por Shiga y col. (2009) en muestras de judía Carioca-Pérola, y Ng y Waldron (1997) en muestras de zanahoria. Por otro lado, en lenteja cocida se aprecia un incremento de (103%) en el total de carbohidratos, provocado únicamente por un incremento en glucosa, mientras que los otros azúcares ven sus niveles reducidos, lo que indica que la cocción degrada los polisacáridos pécticos, y la presencia del almidón resistente. Los resultados ponen de manifiesto que la cocción afecta de distinta manera a los diferentes azúcares, lo que hace variar el perfil de la composición de la fracción CDTA en muestras cocidas respecto a las crudas. En judía cocida los azúcares mayoritarios de esta fracción son arabinosa y AU (36%), mientras que se ha perdido la galactosa presente en las muestras crudas. Esto también contribuye a un brusco aumento de la relación AU/AN de la fracción de CDTA de judía cocida. Asimismo, en la lenteja cocida también se observa la pérdida de galactosa de la fracción de CDTA.

La germinación afecta el contenido de carbohidratos totales de diferentes formas para cada leguminosa estudiada. En la muestra de judía se aprecia un descenso de 58%, debido a reducciones en todos los azúcares, igualmente observado en la literatura (Martín-Cabrejas, 1993). El perfil de azúcares de la fracción CDTA de judía germinada es similar al de judía cruda. Por el contrario, en lenteja germinada se observa un incremento en el valor de carbohidratos totales (107%), resultado muy similar al aumento provocado

por la cocción en lenteja. Todos los otros azúcares tienen sus niveles incrementados en lenteja germinada, principalmente arabinosa (175%), galactosa (150%) y AU (120%), excepto en la manosa. El perfil de azúcares de la fracción CDTA de lenteja germinada muestra una menor presencia de glucosa que en lenteja cruda. Estos resultados demuestran la diferencia en la composición de la pared celular de judía y lentejas, y que los procesamientos afectan de distintas formas el contenido de carbohidratos en la fracción de CDTA.

En resumen, las fracciones de CDTA en las muestras crudas y germinadas son muy similares entre sí, en ambas leguminosas. El estudio pormenorizado de los componentes de la pared celular extraídos por CDTA, ponen de manifiesto la naturaleza de los polisacáridos pécticos presentes en esta fracción (arabinosa, AU y galactosa). El alto contenido de arabinosa, especialmente en judía, y de galactosa, comparado con los valores de AU (Tabla 3.5) indica la presencia de polisacáridos pécticos, probablemente galacturonanos altamente ramificados con arabinosa y/o arabinanos, como componentes de la fracción de CDTA de muestras crudas y germinadas, resultados similares a los indicados por Shiga y col., (2003). En otros trabajos con muestras de leguminosas (Ryden y Selvendran, 1990a; Waldron y col., 1995; Martín-Cabrejas y col., 2003) y otros alimentos (Ryden y Selvendran, 1990b; Ng y Waldron, 1997; Ng y col., 1998) fue observado que la fracción extraída por CDTA presenta como mayor componente los AU, indicando polisacáridos pécticos menos ramificados que en el presente trabajo.

Los resultados obtenidos muestran una clara diferencia en la composición de las muestras cocidas frente a las muestras crudas y germinadas, en ambas leguminosas. Además, la fracción CDTA en judía cocida presenta valores similares de arabinosa y AU lo que indica polisacáridos pécticos no ramificados.

Fracción Na_2CO_3

La etapa de fraccionamiento siguiente al CDTA es la extracción con Na_2CO_3 , donde los polisacáridos pécticos insolubles en la etapa anterior (CDTA) son extraídos en carbonato sódico. El carbonato sódico parece ser capaz de hidrolizar los enlaces débiles éster y liberar una fracción péctica unida covalentemente; no obstante, todavía no hay una clara evidencia de que existan enlaces covalentes entre la pared celular y la fracción soluble en Na_2CO_3 .

Seguir con las etapas del fraccionamiento de los polisacáridos significa solubilizar dichas pectinas y el resto de polímeros, finalizando así la caracterización de sustancias pécticas e iniciando un estudio detallado de las hemicelulosas presentes en estas leguminosas. Esta nueva etapa está compuesta de polisacáridos pécticos de las paredes celulares primarias que sólo pueden ser solubilizados, después de la extracción con CDTA, bajo

condiciones alcalinas medias, lo que sugiere que además de eliminar los puentes de Ca^{2+} que no fueron eliminados en la extracción de CDTA se hidrolizan los enlaces éster entre los residuos de ácido galacturónico y los grupos hidroxilo de los azúcares y grupos fenólicos (Martín-Cabrejas, 1993). Esta extracción se llevó a cabo a 4 °C con el fin de minimizar la β -eliminación de pectinas (Waldron y col., 1995).

Contenido de material celular en Na_2CO_3

El extracto de Na_2CO_3 representa entre el 9% - 17% del RLA, en muestras crudas de judía y lenteja, respectivamente (Figura 3.9). Se trata de la segunda menor fracción, lo que significa que en las muestras estudiadas hay una mayor presencia de polisacáridos pécticos de la pared celular primaria (Na_2CO_3) que de la lámina media (CDTA), según el método de fraccionamiento empleado en el presente trabajo.

Composición en carbohidratos de la fracción de Na_2CO_3

La composición de carbohidratos de la fracción de Na_2CO_3 se muestra en la Tabla 3.6, donde se puede apreciar que la judía cruda (18,2 mg/g RLA) presenta mayor contenido de carbohidratos totales que lenteja (9,9 mg/g RLA), como ocurría también en las fracciones de CDTA. Estos resultados son inferiores a otros trabajos con judías (Ryden y Selvendran, 1990a; Waldron y col., 1995).

Tabla 3.6 – Composición en carbohidratos de la fracción extraída por Na_2CO_3 de leguminosas crudas y procesadas (mg/g RLA).

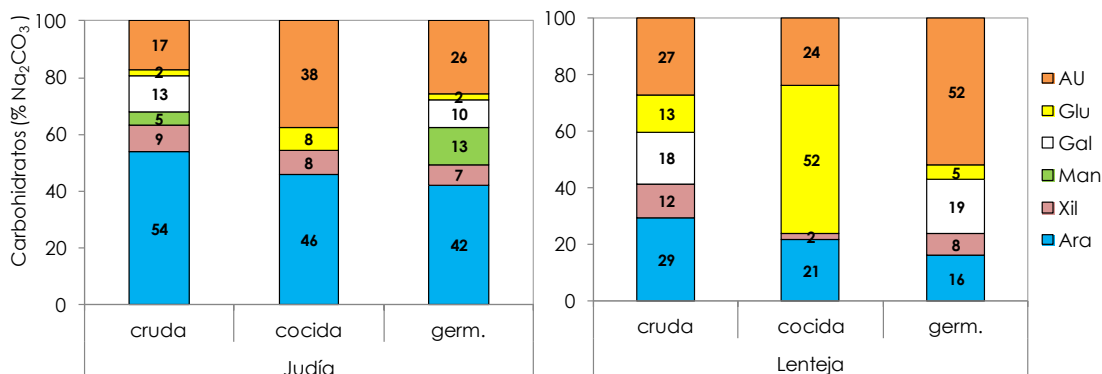
Na_2CO_3		Carbohidratos							
Muestra/ Hidrolisis H_2SO_4		Ara	Xil	Man	Gal	Glc	AU	Total	AU/AN
Judía	Cruda (0,6 M)	9,8 ± 0,2 ^c	1,7 ± 0,2 ^c	0,9 ± 0,1	2,3 ± 0,2	0,4 ± 0,0 ^b	3,1 ± 0,1 ^b	18,2	0,3
	Cocida (0,6 M)	1,1 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^a	nd	nd	0,2 ± 0,1 ^a	0,9 ± 0,1 ^a	2,4	0,8
	Germinada (0,6 M)	7,4 ± 0,1 ^b	1,3 ± 0,0 ^b	2,3 ± 0,0	1,7 ± 0,0	0,4 ± 0,0 ^b	4,5 ± 0,6 ^c	17,6	0,5
Lenteja	Cruda (0,6 M)	2,9 ± 0,2 ^c	1,2 ± 0,1 ^b	nd	1,8 ± 0,2	1,3 ± 0,0 ^b	2,7 ± 0,1 ^b	9,9	0,6
	Cocida (0,6 M)	0,9 ± 0,1 ^a	0,1 ± 0,0 ^a	nd	nd	2,2 ± 0,1 ^c	1,0 ± 0,1 ^a	4,2	1,1
	Germinada (0,6 M)	2,3 ± 0,0 ^b	1,1 ± 0,0 ^b	nd	2,8 ± 0,2	0,7 ± 0,1 ^a	7,5 ± 0,2 ^c	14,4	1,5

Los valores son medias ± DE, n=3. Las medias dentro de una columna y leguminosa con diferente superíndice son significativamente diferentes para $P < 0,05$.

AN: azúcares neutros, AU: ácidos urónicos, Ara: arabinosa, Xil: xilosa, Man: manosa, Gal: galactosa, Glu: glucosa. AU/AN: donde AN = Ara + Gal. nd: no detectada

La composición detallada de los carbohidratos de la fracción de Na_2CO_3 (Tabla 3.6 y Figura 3.11) indica que la muestra de judía cruda está formada principalmente por arabinosa (54%), AU (17%) y galactosa (13%), y en menor proporción por xilosa y glucosa.

Estos valores son similares a los resultados de Shiga y col. (2009) que trabajaron con judía Carioca-Pérola. En lenteja cruda la proporción de arabinosa (29%) es sólo ligeramente superior a la de AU (27%). La galactosa representa un porcentaje también elevado (18%), y la glucosa y xilosa se encuentran en proporciones similares ($\pm 13\%$).



AU: ácidos urónicos, Ara: arabinosa, Xil: xilosa, Man: manosa, Gal: galactosa, Glu: glucosa

Figura 3.11 – Porcentaje de azúcares neutros y ácidos urónicos que componen la fracción de Na_2CO_3 de leguminosas crudas y procesadas.

Con respecto a los procesamientos, la cocción provoca reducciones en el contenido de carbohidratos totales de la fracción de Na_2CO_3 , en judía (86%) y en lenteja (58%). Esta disminución también es observada para cada azúcar estudiado, en ambas leguminosas. De esta forma, las reducciones más notables se aprecian en los niveles de galactosa que presentan valores de 2,3 mg/g RLA (judía) y 1,8 mg/g RLA (lenteja) que después de la cocción no se detectan. La arabinosa presenta su contenido reducido en 89% en judía cocida y 69% en lenteja cocida, mientras que los AU ven su nivel reducido en un 70% en judía cocida y 62% en lenteja cocida, comparado con las muestras crudas. Sin embargo, en lenteja cocida se observa un incremento de 69% en glucosa, que puede indicar la presencia de almidón resistente en la pared celular primaria durante la cocción. Asimismo, se puede inferir que la cocción provoca degradación de los polisacáridos, principalmente de las pectinas, en las leguminosas estudiadas.

De acuerdo con los resultados de germinación de la fracción extraída por Na_2CO_3 , ésta provoca un importante incremento en el total de carbohidratos en lenteja (46%), mientras que en judía apenas se aprecian cambios. Los incrementos observados en lenteja germinada se deben principalmente a un aumento en los niveles de AU (177%) y de galactosa (55%). En judía germinada también se observa un incremento en los valores de AU (45%), mientras que en casi todos los otros azúcares se aprecian reducciones en

sus niveles, lo que provoca que no exista variación en el total de carbohidratos de judía germinada.

El estudio más detallado de la composición de carbohidratos del extracto de Na_2CO_3 pone de manifiesto que las muestras crudas y germinadas de judía presentan mayores contenidos de arabinosa en comparación al valor de AU, lo que puede indicar polisacáridos pécticos formados por galacturonanos altamente ramificados con arabinosa y/o arabinanos que componen la pared celular primaria. Por lo contrario, en lenteja cruda y germinada y en las muestras cocidas de ambas leguminosas, se observa que el contenido de AU es igual o superior al de arabinosa, lo que indica que la pared celular de estas muestras presenta polisacáridos pécticos menos ramificados, posiblemente del tipo homogalacturonanos.

Fracciones KOH 1M y KOH 4M

En la etapa KOH 1 M se da por terminada la cuantificación de polisacáridos pécticos y se inicia la cuantificación de hemicelulosas, del material parcialmente despectinizado. Las hemicelulosas son extraídas mediante dos extracciones: KOH 1 M y KOH 4 M; que afectan desde enlaces éster hasta los puentes de H. En la primera etapa (KOH 1 M) se extraen principalmente polisacáridos hemicelulósicos del tipo xiloglucanos altamente ramificados, y también glicoproteínas y proteoglicanos. Posteriormente, la fracción extraída por KOH 4 M extrae y cuantifica los componentes de las hemicelulosas, principalmente xiloglucanos ligeramente ramificados y xilanos.

Asimismo se pueden extraer otras hemicelulosas caracterizadas por polímeros de xilosa y arabinosa como elementos mayoritarios, de ahí el nombre de pentosanas o arabinoxilanos. Tiene como características importantes, la hidrofilia y la elevada retención de agua (Adrian y col., 2000).

Contenido de material celular en KOH 1 M y 4 M

En la primera extracción con KOH se observa que el contenido extraído por KOH 1 M representa 9% - 21% del total de RLA en las muestras de leguminosas (Figura 3.9). Es muy superior el porcentaje que representa esta fracción en la muestra de lenteja cruda (21%) en comparación con la muestra de judía cruda (10%). Con la cocción este porcentaje parece que no se modifica en relación a la muestra cruda. Sin embargo, la germinación disminuye la fracción de KOH 1 M en lenteja (de 21% a 15%), mientras que en judía germinada no se aprecian cambios.

En relación a la fracción de KOH 4 M, se observa que en lenteja cruda esta fracción presenta mayor porcentaje (16%) que en judía cruda (4%), y que los procesamientos

provocan un incremento en los porcentajes de KOH 4 M en judía, mientras que en lenteja se aprecia una reducción en los niveles de esta fracción en ambos procesamiento, respecto a lenteja cruda.

Composición en carbohidratos de las fracciones de KOH

La composición en carbohidratos de la fracción de KOH 1M (Tabla 3.7 y Figura 3.12) revela que judía cruda (141 mg/g RLA) presenta mayor contenido que lenteja (123 mg/g RLA). El estudio detallado de la composición de carbohidratos indica que las muestras de judía y lenteja crudas son muy similares entre sí, y que ambas presentan glucosa como el monosacárido mayoritario de la fracción de KOH 1 M, seguido de arabinosa, xilosa y AU y en menor proporción galactosa. Además, la lignina representa cerca de 9% del total de la fracción de KOH 1 M de las leguminosas crudas.

Sin embargo en el análisis de la fracción de KOH 4M (Tabla 3.8 y Figura 3.13) se aprecia que lenteja cruda presenta mayor contenido de carbohidratos totales (140 mg/g RLA) que judía cruda (53 mg/g RLA), aunque se observan similitudes en la composición de sus fracciones, así se muestra como componente mayoritario la arabinosa ($\pm 37\%$), seguida de glucosa ($\pm 28\%$) y por xilosa ($\pm 17\%$), y en menor proporción por AU, galactosa y lignina.

En la literatura (Ryden y Selvendran, 1990a; Waldron y col., 1995; Martín-Cabrejas y col., 2003) observaron resultados similares al presente trabajo, donde las fracciones de KOH estaban formadas principalmente por glucosa, arabinosa, AU y xilosa, encontrándose este último monosacárido en mayor proporción en las fracciones más concentradas de KOH.

Tabla 3.7 – Composición en carbohidratos de la fracción extraída por KOH 1 M de leguminosas crudas y procesadas (mg/g RLA).

		Carbohidratos										
Muestra/ Hidrolisis H ₂ SO ₄		Ara	Xil	Man	Gal	Glc	AU	Total (AU + AN)	Lignina	Total*	AU/AN	Xil/Glu
Judía	KOH 1 M											
	Cruda (12 M)	12,5 ± 0,3^B	7,6 ± 0,6^A	nd	1,9 ± 0,2	55,4 ± 0,9^C	5,2 ± 0,2^B	80,8 ± 2,4^C	11,0 ± 0,1^A	140,8	0,4	0,1
	(0,6 M)	23,1 ± 2,3 ^c	12,2 ± 2,2 ^a	nd	4,7 ± 0,4	83,6 ± 4,2 ^c	6,2 ± 0,1 ^c	127,7 ± 2,2 ^c			0,2	0,1
	Cocida (12 M)	8,4 ± 0,1^A	42,6 ± 0,3^C	nd	nd	12,1 ± 0,1^B	3,3 ± 0,1^A	65,4 ± 2,2^B	15,9 ± 0,1^B	84,0	0,4	3,5
	(0,6 M)	9,1 ± 0,9 ^a	39,5 ± 3,1 ^b	nd	nd	13,1 ± 1,1 ^b	2,5 ± 0,1 ^a	63,4 ± 4,8 ^b			0,3	3,0
	Germinada (12 M)	9,8 ± 1,4^A	21,7 ± 0,3^B	nd	0,6 ± 0,1	5,8 ± 0,2^A	3,2 ± 0,1^A	40,4 ± 0,6^A	17,1 ± 0,1^C	60,5	0,3	3,7
Lenteja	(0,6 M)	11,4 ± 0,6 ^b	13,3 ± 1,4 ^a	nd	1,2 ± 0,2	5,9 ± 0,2 ^a	3,1 ± 0,1 ^b	34,0 ± 2,4 ^a			0,2	2,3
	Cruda (12 M)	6,1 ± 0,2^B	9,5 ± 0,4^A	nd	2,7 ± 0,2	40,6 ± 1,7^B	4,4 ± 0,1^B	63,3 ± 1,8^B	12,9 ± 0,1^A	123,3	0,5	0,2
	(0,6 M)	10,8 ± 0,3 ^c	18,5 ± 0,4 ^a	nd	3,6 ± 0,3	73,1 ± 1,2 ^b	2,5 ± 0,2 ^a	108,4 ± 3,6 ^b			0,2	0,3
	Cocida (12 M)	4,7 ± 0,1^A	103,8 ± 0,2^C	nd	nd	58,5 ± 1,2^C	3,3 ± 0,0^A	169,3 ± 2,9^C	21,0 ± 0,1^B	246,3	0,7	1,8
	(0,6 M)	6,1 ± 0,9 ^a	119,1 ± 17,7 ^c	nd	nd	96,6 ± 16,0 ^c	3,5 ± 0,2 ^b	224,6 ± 17,7 ^c			0,6	1,2
	Germinada (12 M)	6,1 ± 0,4^B	31,6 ± 0,4^B	nd	3,6 ± 0,3	3,4 ± 0,2^A	5,8 ± 0,2^C	50,5 ± 0,5^A	28,0 ± 0,1^C	92,5	0,6	9,3
	(0,6 M)	7,7 ± 0,5 ^b	44,0 ± 3,8 ^b	nd	3,3 ± 1,7	2,9 ± 0,2 ^a	5,5 ± 0,8 ^c	63,5 ± 3,7 ^a			0,5	15,2

Los valores son medias ± DE, n=3. Las medias dentro de una columna y leguminosa con diferente superíndice son significativamente diferentes para P<0,05

En negrita – hidrólisis fuerte 12 M H₂SO₄; la línea justamente abajo expresa los valores de hidrólisis suave 0,6 M H₂SO₄

AN: azúcares neutros, AU: ácidos urónicos, Ara: arabinosa, Xil: xilosa, Man: manosa, Gal: galactosa, Glu: glucosa. AU/AN: donde AN = Ara + Gal. nd: no detectada

*Total de carbohidratos: suma de los mayores valores observados entre 12 M y 0,6 M

Tabla 3.8 – Composición en carbohidratos de la fracción extraída por KOH 4 M de de leguminosas crudas y procesadas (mg/g RLA).

	Muestra/ Hidrolisis H ₂ SO ₄	Carbohidratos					AU	Total (AU + AN)	Lignina	Total*	AU/AN	Xil/Glu
		Ara	Xil	Man	Gal	Glc						
Judía	KOH 4 M											
	Cruda (12 M)	16,6 ± 0,4^B	7,2 ± 0,3^A	nd	1,1 ± 0,1	11,3 ± 0,2^C	5,9 ± 0,1^C	42,0 ± 1,0^A	1,5 ± 0,1^A	52,9	0,3	0,6
	(0,6 M)	21,3 ± 0,7 ^b	7,3 ± 0,2 ^a	nd	1,9 ± 0,2	14,7 ± 0,3 ^c	6,2 ± 0,1 ^c	51,3 ± 1,3 ^a			0,3	0,5
	Cocida (12 M)	3,6 ± 0,5^A	69,8 ± 2,3^C	nd	nd	5,6 ± 0,1^B	2,0 ± 0,1^B	81,0 ± 2,6^B	5,6 ± 0,1^C	86,9	0,6	12,5
	(0,6 M)	3,9 ± 0,2 ^a	58,5 ± 1,3 ^c	nd	nd	5,6 ± 0,2 ^a	1,9 ± 0,2 ^a	69,2 ± 0,6 ^b			0,5	10,4
	Germinada (12 M)	3,8 ± 0,2^A	33,6 ± 1,5^B	nd	0,4 ± 0,1	3,0 ± 0,1^A	0,5 ± 0,1^A	41,6 ± 1,7^A	2,2 ± 0,1^B	96,8	0,1	11,2
Lenteja	(0,6 M)	32,3 ± 3,3 ^c	46,5 ± 0,2 ^b	nd	2,8 ± 0,3	8,2 ± 0,5 ^b	4,8 ± 0,3 ^b	92,9 ± 9,7 ^c			0,1	5,7
	Cruda (12 M)	29,8 ± 2,5^C	14,8 ± 0,3^A	nd	5,1 ± 0,5	19,3 ± 0,9^C	7,2 ± 0,2^C	76,3 ± 3,7^B	3,1 ± 0,1^A	140,4	0,2	0,8
	(0,6 M)	48,5 ± 1,3 ^c	30,0 ± 0,5 ^a	nd	10,8 ± 0,2	40,8 ± 1,0 ^c	0,2 ± 0,0 ^a	130,3 ± 2,6 ^b			0,0	0,7
	Cocida (12 M)	8,2 ± 2,0^A	53,2 ± 11,1^C	nd	nd	11,2 ± 1,2^B	2,1 ± 0,2^A	74,0 ± 9,2^B	11,6 ± 0,2^B	132,3	0,3	4,8
	(0,6 M)	9,8 ± 1,3 ^a	95,9 ± 3,6 ^c	nd	nd	12,9 ± 0,1 ^b	1,9 ± 0,1 ^c	119,8 ± 3,9 ^a			0,2	7,4
	Germinada (12 M)	12,8 ± 1,2^B	31,8 ± 2,0^B	nd	4,8 ± 0,5	4,9 ± 0,2^A	6,5 ± 0,1^B	60,7 ± 3,7^A	14,8 ± 0,0^C	136,1	0,4	6,5
	(0,6 M)	15,6 ± 1,0 ^b	88,8 ± 1,5 ^b	nd	5,5 ± 0,7	4,5 ± 0,2 ^a	0,6 ± 0,0 ^b	115,0 ± 1,9 ^a			0,0	19,7

Los valores son medias ± DE, n=3. Las medias dentro de una columna y leguminosa con diferente superíndice son significativamente diferentes para P<0,05

En negrita – hidrólisis fuerte 12 M H₂SO₄; la línea justamente abajo expresa los valores de hidrólisis suave 0,6 M H₂SO₄

AN: azúcares neutros, AU: ácidos urónicos, Ara: arabinosa, Xil: xilosa, Man: manosa, Gal: galactosa, Glu: glucosa. AU/AN: donde AN = Ara + Gal. nd: no detectada

*Total de carbohidratos: suma de los mayores valores observados entre 12 M y 0,6 M.

La cocción provoca cambios significativos en el contenido total de carbohidratos en la fracción de KOH 1 M (Figura 3.12). Si por un lado en judía cocida se aprecia una reducción del 40%, por otro lado, en lenteja cocida se observa un incremento muy relevante (de 98%), debido principalmente al aumento en los niveles de xilosa (de 19 mg/g RLA a 119 mg/g RLA) con respecto a la muestra cruda. Asimismo, en la fracción de KOH 4 M (Figura 3.13) , las muestras cocidas presentan un incremento de los porcentajes de xilosa (del 17% al 76%, aproximadamente) y una reducción general en los otros azúcares, lo que podría ser debido a una degradación de los polisacáridos, provocada por el tratamiento térmico. Estos resultados coinciden con los estudios realizados por Martín-Cabrejas (1993).

Con respecto al tratamiento de germinación, éste afecta la pared celular de leguminosas de forma significativa, principalmente reduciendo el contenido de glucosa e incrementando los valores de lignina en ambas leguminosas y en las dos fracciones de KOH, siendo los contenidos de lignina más destacados en la fracción de KOH 1 M. Martín-Cabrejas y col. (2003) también observó reducciones en los contenidos de glucosa de muestras germinadas de garbanzos, en la fracción de KOH 0,5 M.

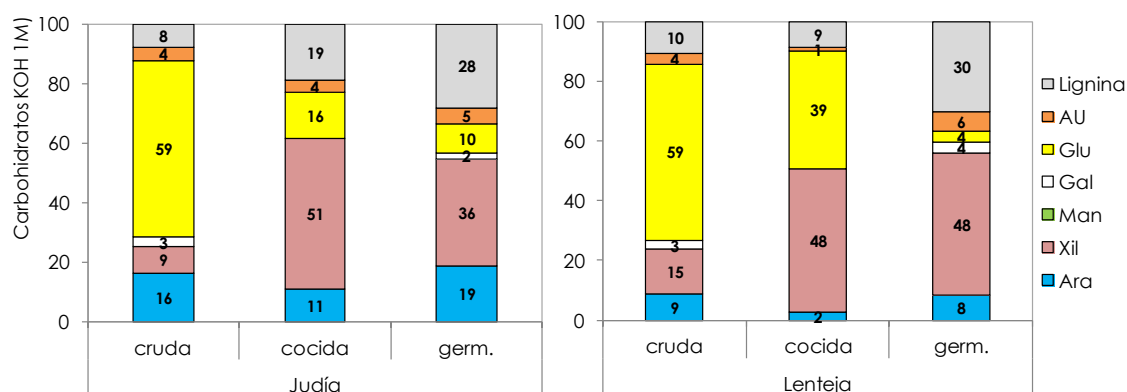


Figura 3.12 – Porcentaje de azúcares neutros, ácidos urónicos y lignina que componen la fracción de KOH 1 M de leguminosas crudas y procesadas.

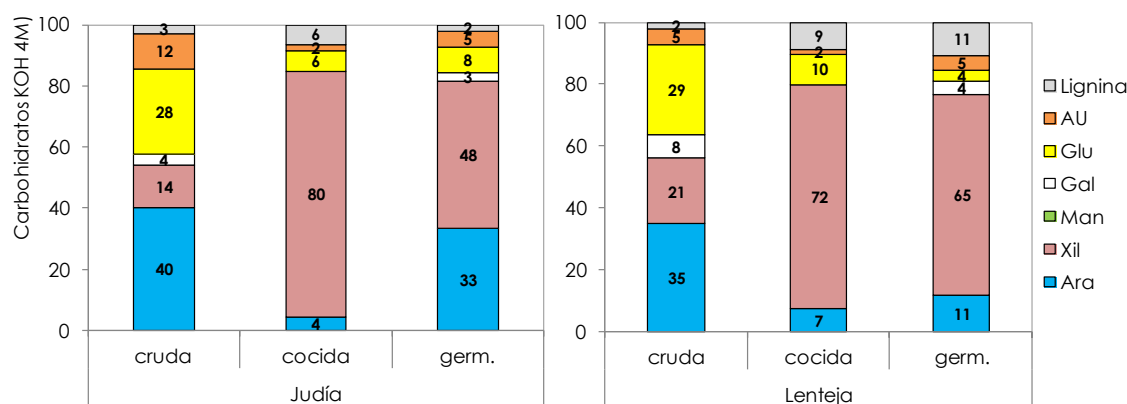


Figura 3.13 – Porcentaje de azúcares neutros, ácidos urónicos y lignina que componen la fracción de KOH 4 M de leguminosas crudas y procesadas.

El estudio pormenorizado de los polisacáridos de la pared celular extraídos en KOH 1 M y KOH 4 M revelan que las hemicelulosas de las leguminosas procesadas están formadas, en general, por xilosa obtenida en condiciones de hidrólisis suave junto a glucosa, lo que indica la presencia xilanos o xiloglucanos no unidos a la matriz celulósica sino a la matriz hemicelulósica, tal y como se esperaba. La gran representatividad de arabinosa indica la presencia de arabinanos o arabinoxilanos procedentes de las paredes celulares primarias (Waldron y Selvendran, 1992; Le Goff y col., 2001; Renard y col., 1997; Weightman y col., 1994; Schols y col., 1995; Yu y Mort, 1996; Huisman y col., 1996, 1998, 1999).

La pared celular de las leguminosas está generalmente descrita como una estructura rica en pectina, rica en arabinanos (Brett y Waldron, 1990). La mayor parte de los polisacáridos de la pared pueden ser extraídos en condiciones alcalinas, lo que indica una fuerte asociación entre ellos. Estudios realizados por Reichert (1981) muestran que la pared celular de cotiledones de guisantes estaba compuesta en gran medida por polisacáridos ricos en arabinosa y por hemicelulosa, mientras que su tegumento consiste fundamentalmente en celulosa. Se sabe que la cubierta de las semillas presenta mayor contenido de hemicelulosas que el material presente en el endospermo; de esta forma se puede decir que las fracciones de KOH indican la elevada presencia de hemicelulosas de tipo xilano y/o xiloglucanos procedentes de las cubiertas de las semillas de judía y lenteja.

Asimismo, es preciso destacar en la fracción KOH 4 M la presencia de arabinosa y xilosa junto a bajos niveles de ácidos urónicos, lo que indica la existencia conjunta de hemicelulosas de tipo xilanos y/o arabinoxilanos junto a sustancias pécticas de tipo homogalacturonano, como se observa en la pulpa de aceituna (Coimbra y col., 1995). Además, en condiciones de hidrólisis suave se detectan niveles elevados de glucosa lo que confirma la presencia de almidón resistente que se encuentra íntimamente enlazado a los anteriores polisacáridos. Por otro lado, se pone de manifiesto la ausencia de manosa, en todas las dos fracciones de KOH, lo que indica la inexistencia de glucomanos en la matriz de hemicelulosas de judía y lenteja crudas y procesadas.

Fracción Residuo (α -celulosa)

En esta etapa se cuantifica principalmente celulosa junto a polisacáridos pécticos y glucoproteínas muy unidos a la celulosa. Este polisacárido se encuentra en frutas, hortalizas y cereales como constituyente estructural de las paredes celulares y puede estar unido a hemicelulosas y lignina. La presencia de celulosa en los productos vegetales puede incrementar la viscosidad en la preparación y elaboración de alimentos debido a su capacidad de retención de agua.

Contenido de material celular en la fracción residual

En relación al material obtenido al final del fraccionamiento (residuo o α -celulosa) se observa que en las muestras crudas de judía el porcentaje de residuo es muy superior (72%) al encontrado en lenteja (39%) (Figura 3.9). La cocción afecta las leguminosas de forma diferente; en judía se reduce ligeramente el nivel de la fracción residual, de 72% a 69%, mientras que se observa un incremento notable en lenteja (de 39% a 53%). Del mismo modo, el porcentaje del residuo en judía germinada se reduce (del 72% a 65%), mientras que aumenta en lenteja germinada (del 39% a 50%).

Composición en carbohidratos de la fracción residual

La composición de los carbohidratos (Tabla 3.9 y Figura 3.14) muestra que la fracción del residuo en judía cruda (564 mg/g RLA) presenta un contenido de azúcares totales muy superior a la muestra cruda de lenteja (228 mg/g RLA); estos altos contenidos de carbohidratos provienen especialmente de una importante presencia de glucosa. De esta forma, los carbohidratos que forman la pared celular de la judía cruda son la glucosa (66%), seguida de arabinosa (16%) y ácidos urónicos (12%) y finalmente proporciones menores de xilosa, galactosa y lignina. Asimismo, el residuo final de la muestra cruda de lenteja presenta como azúcar mayoritario la glucosa (75%), arabinosa (10%) y xilosa (8%), y en menor concentración se encuentran la galactosa, AU y lignina. Ryden y Selvendran (1990a), Martín-Cabrejas (1993), Ng Waldron (1997), Ng y col. (1998), Martín-Cabrejas y col. (2003) y Shiga y col. (2009) también observaron similar composición de carbohidratos en el residuo final encontrado en el fraccionamiento de diferentes alimentos vegetales.

Tabla 3.9 – Composición en carbohidratos del material residual (α -celulosa) del fraccionamiento de leguminosas crudas y procesadas (mg/g RLA).

Muestra/ Hidrólisis H ₂ SO ₄		Carbohidratos					AU	Total (AU + AN)	Lignina	Total*	AU/AN	Xil/Glu
		Ara	Xil	Man	Gal	Glc						
Judía	RESIDUO											
	Cruda (12 M)	85,5 ± 1,7^B	22,4 ± 1,4^B	nd	5,7 ± 0,1	372,0 ± 5,0^C	65,5 ± 1,6^B	529,2 ± 42,2^{AB}	8,1 ± 0,2^A	563,6	0,7	0,1
	(0,6 M)	89,9 ± 1,2 ^c	17,9 ± 0,2 ^c	nd	5,3 ± 0,3	27,1 ± 3,7 ^b	42,5 ± 3,5 ^b	181,9 ± 4,8 ^b			0,4	0,1
	Cocida (12 M)	71,5 ± 2,1^A	10,6 ± 1,1^A	nd	nd	335,0 ± 6,3^A	67,7 ± 3,7^B	456,5 ± 55,3^A	18,2 ± 0,2^B	501,2	0,9	0,0
	(0,6 M)	69,5 ± 2,6 ^a	5,3 ± 0,1 ^a	nd	nd	14,1 ± 0,2 ^a	30,8 ± 2,2 ^a	119,1 ± 4,4 ^a			0,4	0,4
	Germinada (12 M)	93,2 ± 4,3^C	22,8 ± 1,2^B	nd	5,7 ± 0,3	352,0 ± 12,0^B	57,1 ± 1,3^A	531,0 ± 15,5^B	26,1 ± 0,2^C	557,8	0,6	0,1
Lenteja	(0,6 M)	72,5 ± 0,8 ^b	9,9 ± 0,1 ^b	nd	6,6 ± 0,2	55,1 ± 1,2 ^c	32,8 ± 0,3 ^a	176,8 ± 1,8 ^b			0,4	0,2
	Cruda (12 M)	28,0 ± 0,6^B	10,6 ± 0,4^B	nd	3,1 ± 0,3	167,1 ± 8,3^A	5,5 ± 0,6^A	199,6 ± 9,2^A	2,7 ± 0,0^A	227,8	0,2	0,1
	(0,6 M)	22,4 ± 1,5 ^b	18,1 ± 1,7 ^c	nd	6,4 ± 0,1	45,6 ± 2,1 ^c	2,6 ± 0,1 ^a	95,2 ± 5,3 ^b			0,1	0,4
	Cocida (12 M)	18,7 ± 0,6^A	7,3 ± 0,5^A	nd	nd	360,1 ± 7,5^C	33,6 ± 0,6^B	419,5 ± 8,7^B	37,3 ± 0,3^C	457,0	1,8	0,0
	(0,6 M)	18,5 ± 0,9 ^a	4,3 ± 0,1 ^a	nd	0,8 ± 0,1	25,7 ± 0,9 ^b	12,6 ± 0,7 ^b	61,8 ± 1,1 ^a			0,7	0,2
	Germinada (12 M)	31,7 ± 2,5^C	14,4 ± 1,1^C	nd	9,4 ± 0,5	324,7 ± 14,6^B	35,9 ± 3,6^B	416,1 ± 18,4^B	29,8 ± 0,3^B	445,9	0,9	0,0
	(0,6 M)	28,5 ± 1,0 ^c	4,8 ± 0,2 ^b	nd	6,0 ± 0,6	10,9 ± 0,7 ^a	13,7 ± 0,4 ^b	63,8 ± 1,5 ^a			0,4	0,4

Los valores son medias ± DE, n=3. Las medias dentro de una columna y leguminosa con diferente superíndice son significativamente diferentes para P<0,05.

En negrita – hidrólisis fuerte 12 M H₂SO₄; la línea justamente abajo expresa los valores de hidrólisis suave 0,6 M H₂SO₄.

AN: azúcares neutros, AU: ácidos urónicos, Ara: arabinosa, Xil: xilosa, Man: manosa, Gal: galactosa, Glu: glucosa. AU/AN: donde AN = Ara + Gal. nd: no detectada

*Total de carbohidratos = suma de los mayores valores observados entre 12 M y 0,6 M.

Respecto a la cocción, este proceso incrementa notablemente el contenido total de carbohidratos en la fracción residual de lenteja (101%), mientras que en el caso de judía se aprecia una reducción (11%). En la literatura (Shiga y col., 2009) también observaron reducciones en los niveles de carbohidratos de la fracción residual en muestras cocidas. El incremento apreciado en lenteja se debe principalmente a un drástico aumento en los niveles de glucosa (115%) y AU (casi 6 veces superior al valor de la muestra cruda). En relación a la germinación, este procesamiento produce cambios similares a los observados en judía y lenteja cocidas. Además, otros autores (Martín-Cabrejas y col., 2003) observaron incrementos en el total de carbohidratos de la fracción residual en muestras de guisantes germinados en la oscuridad, y este aumento fue debido principalmente a la glucosa.

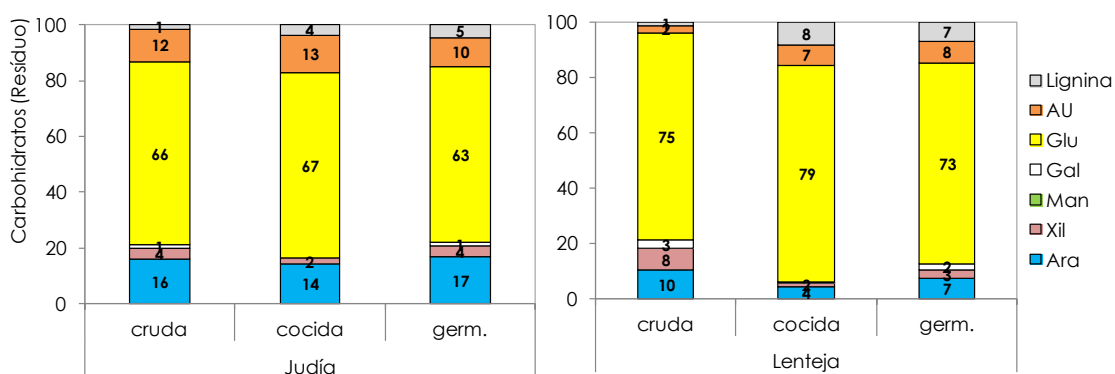


Figura 3.14 – Porcentaje de azúcares que componen la fracción residual de leguminosas crudas y procesadas.

Por lo tanto, a la vista de los resultados obtenidos, se observa que los residuos finales resultantes tras el fraccionamiento secuencial presentan significativas diferencias en su composición química. En el caso de judía el residuo final está constituido por un esqueleto de celulosa, encontrándose una importante proporción de sustancias pécticas de tipo homogalacturonanos, altamente ramificados de arabinosa y/o arabinanos que se encuentran unidos a las cadenas de celulosa ya que se solubilizaran en condiciones ácidas fuertes. La presencia de sustancias pécticas que son capaces de soportar las condiciones alcalinas concentradas también se han observado en otros productos como cebolla y patata (Selvendran y col., 1990; Benítez, 2011). Sin embargo, el residuo final en lenteja cruda pone de manifiesto que este residuo no sólo esté constituido por el polisacárido celulosa, sino que existen importantes cantidades de polisacáridos hemicelulósicos (arabinosa y xilosa) que constituirán arabinoxilanos íntimamente enlazados al esqueleto de celulosa.

3.5 CONCLUSIONES PARCIALES

- ✓ El residuo libre de almidón (RLA) de muestras crudas de judía de Tolosa y lenteja de La Armuña está compuesto principalmente por glucosa, arabinosa y ácidos urónicos, mostrando cada leguminosa sus propias características en relación a su pared celular. Los procesamientos tanto de cocción como de germinación afectan significativamente a la composición de carbohidratos de la pared celular. En ambas leguminosas, la cocción provoca importantes incrementos en los niveles de glucosa y notables reducciones en los contenidos de arabinosa, mientras que la germinación aumenta el contenido de lignina..
- ✓ En la fracción extraída con CDTA se aprecia que en la muestra de judía cruda el azúcar principal es la arabinosa. Sin embargo, en lenteja la galactosa es el azúcar mayoritario. Estos resultados ponen de manifiesto que la fracción de CDTA extrae principalmente polisacáridos pécticos, aunque de distinta naturaleza en judía y en lenteja.
- ✓ La cocción en judías provoca que el total de carbohidratos extraídos en la fracción de CDTA disminuya notablemente, debido a pérdidas de la mayoría de los azúcares. Por el contrario, en lenteja cocida se aprecia un incremento, provocado únicamente por el aumento en glucosa, mientras que los otros azúcares ven sus niveles reducidos, lo que indica que la cocción degrada los polisacáridos pécticos y origina la presencia de almidón resistente.
- ✓ En la germinación de judías el contenido de carbohidratos totales desciende, debido a reducciones en todos los azúcares, mientras que en lenteja germinada se observa un incremento. Estos resultados demuestran la diferencia en la composición de la pared celular de judías y lentejas, y el diferente efecto de los procesamientos.
- ✓ La fracción de Na_2CO_3 está formada principalmente por arabinosa, ácidos urónicos y galactosa. La cocción provoca reducciones en el contenido de carbohidratos totales de esta fracción, debido principalmente a la degradación de pectinas. No obstante, en lenteja cocida se observa un enriquecimiento en glucosa, que puede indicar la presencia de almidón resistente en la pared celular primaria como consecuencia de la cocción.
- ✓ La germinación provoca un importante incremento en el total de carbohidratos de la fracción Na_2CO_3 en lenteja, principalmente debidos al aumento de ácidos urónicos y galactosa, mientras que en judía apenas se aprecian cambios.
- ✓ La composición en azúcares de la fracción Na_2CO_3 pone de manifiesto que las muestras crudas y germinadas de judía presentan mayores contenidos de arabinosa

en comparación con el valor de ácidos urónicos, indicando la presencia de galacturonanos altamente ramificados con arabinosa y/o arabinanos. Por el contrario, en lenteja cruda y germinada, así como en las muestras cocidas de ambas leguminosas, el contenido de urónicos es igual o superior al de arabinosa, sugiriendo la presencia de polisacáridos pécticos menos ramificados, posiblemente del tipo homogalacturonanos.

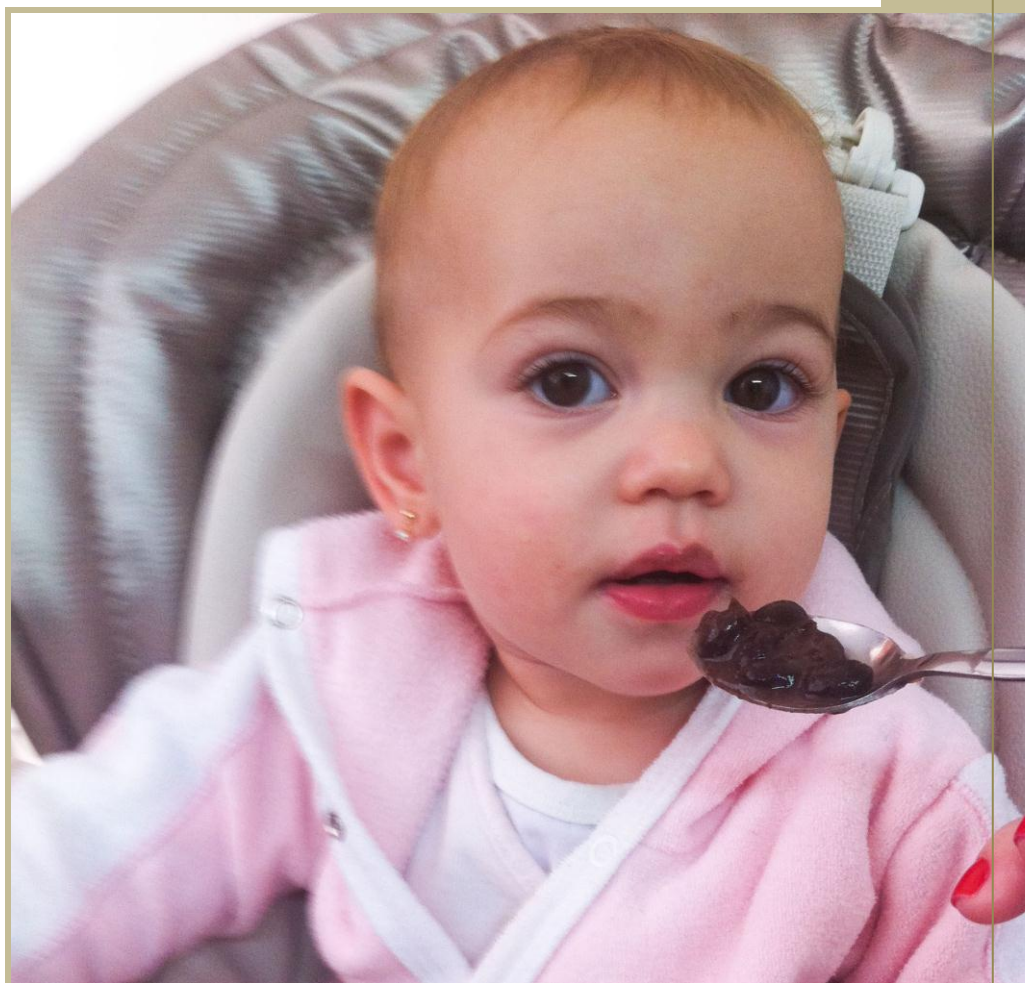
- ✓ La composición de la fracción de KOH 1M indica que las muestras de judía y lenteja crudas son muy similares entre sí, y que en ambas la glucosa es mayoritaria. Asimismo es de destacar la presencia de lignina. Sin embargo, en el análisis de la fracción de KOH 4M se aprecia que el componente mayoritario es la arabinosa y en menor proporción ácidos urónicos, galactosa y lignina.
- ✓ Las muestras cocidas presentan un incremento de los porcentajes de xilosa y una reducción general en los otros azúcares en estas fracciones, lo que podría ser debido a una degradación térmica de la mayoría de los polisacáridos.
- ✓ La germinación afecta la pared celular de leguminosas de forma significativa, principalmente reduciendo el contenido de glucosa e incrementando los valores de lignina en las fracciones de KOH de ambas leguminosas. El estudio pormenorizado de los polisacáridos de la pared celular extraídos en KOH 1 M y KOH 4 M revelan que las hemicelulosas de las leguminosas procesadas están formadas, en general, por xilosa obtenida en condiciones de hidrólisis suave junto a glucosa, lo que indica la presencia xilanos o xiloglucanos no unidos a la matriz celulósica sino a la matriz hemicelulósica.
- ✓ Los principales azúcares del residuo final del fraccionamiento son glucosa y arabinosa. En el caso de judía estaría constituido por un esqueleto de celulosa, encontrándose una importante proporción de sustancias pécticas de tipo homogalacturonanos, altamente ramificados con arabinosa, y/o arabinanos. Sin embargo, en lenteja cruda este residuo no sólo está constituido por celulosa, sino que existen importantes cantidades de polisacáridos hemicelulósicos (arabinosa y xilosa) posiblemente arabinoxilanos íntimamente enlazados al esqueleto de celulosa.
- ✓ Los procesos de cocción y de germinación incrementan notablemente el contenido total de carbohidratos en la fracción residual de lenteja, debido a un drástico aumento en los niveles de glucosa y ácidos urónicos, mientras que en el caso de judía apenas se aprecian variaciones.

"Buen alimento, mejor pensamiento."

Anónimo

Capítulo 4 - ESTUDIO DE LA FRACCIÓN PROTEICA EN LA HARINA DE LEGUMINOSA PROCESADA

4



Emanuelle Sarmento Coutinho

Capítulo 4 - ESTUDIO DE LA FRACCIÓN PROTEICA EN LA HARINA DE LEGUMINOSA PROCESADA

4.1 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

La calidad nutricional de las proteínas viene determinada por su composición en aminoácidos y su digestibilidad, así como sus propiedades funcionales. Las legumbres se caracterizan por su elevado contenido proteico que en las semillas oscila desde un 20-30% en guisantes y judías, hasta un 38-40% en soja y el altramuiz (lupino) (Guéguen y Cerletti, 1994). La fracción proteica más abundante son las globulinas, solubles en disoluciones salinas, relativamente pobres en aminoácidos azufrados (metionina, cisteína y triptófano), pero con contenidos de lisina muy superiores a los de los granos de cereales, de forma que leguminosas y cereales se complementan en el aporte proteico (Olmedilla-Alonso y col., 2010). El consumo combinado de cereales y legumbres generalmente alivia estas carencias mutuas que aseguran una dieta equilibrada, sabiendo que los cereales y legumbres son consumidos en la proporción de 2:1.

Asimismo, la estructura y la presencia de otros componentes de la semilla (almidón, hemicelulosa, minerales, polifenoles) tienen un gran efecto sobre la digestibilidad proteica (Deshpande y Demondaran, 1989). A pesar de la gran importancia del cultivo de leguminosas, la caracterización de proteínas de algunas variedades no ha sido estudiada ampliamente, salvo lo referente a proteínas específicas como el caso de las faseolinas o argelinas (Montoya y col., 2008). Estudios preliminares, demuestran que las globulinas (vicilinas, convicilinas y leguminas) representan la mayoría de las proteínas de reserva en las semillas de leguminosas (Croy y col., 1980). Algunas de estas proteínas que son generalmente clasificadas como proteínas de reserva, tienen su función asociada a la germinación y a las funciones de defensa (Agizzio y col., 2003).

Las principales proteínas encontradas en la semilla de judía común son faseolinas, lectinas y argelinas (Osborn y Brown, 1988). La faseolina es deficiente en aminoácidos azufrados y es la principal fracción proteínica de la judía, representando 40-60% de la proteína total. Es una globulina soluble en soluciones salinas (NaCl 0,5 M). Además de las mencionadas, se han descrito otras proteínas de judía común basándose en su solubilidad. Respecto a la proteína total, las judías contienen 36-46% de globulina-1 (faseolina), 5-12% de globulina-2 (principalmente lectinas), 12-16% de albúminas, 2-4% de prolaminas y 20-30% de proteína soluble en álcali. Sathe y col., (1985) sugieren que las albúminas y las globulinas representan 21 y 71%, respectivamente, de las proteínas totales de la judía.

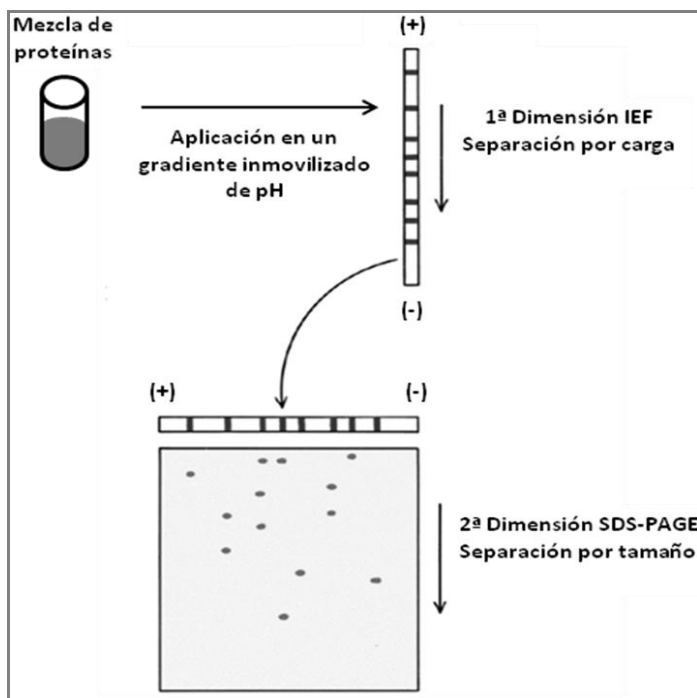
En relación a la lenteja, esta leguminosa presenta en sus semillas una abundante composición en proteínas (Scippa y col., 2010), principalmente compuesta por las globulinas (vicilinas, convicilinas y leguminas), que son clasificadas como proteínas de reserva. También se encuentra la ferridrina que recientemente fue relacionada con la protección contra daño oxidativo, y que también está relacionada con la germinación de las semillas (Ravet y col., 2009). La presencia de enzimas como enolasa, β -galactosidasa, proteinasa, ATPasa (Scippa y col., 2010), que son esenciales para la eficiente degradación de polisacáridos y proteínas, como también en la producción de ATP, indica que las semillas de leguminosas están preparadas para liberar rápidamente la energía y los nutrientes (proteínas de reserva) para el desarrollo inmediato de la planta (Buckeridge y Reid, 1994).

La electroforesis en geles de poliacrilamida es uno de los métodos más utilizados para la purificación, análisis y caracterización de proteínas. Uno de los métodos de electroforesis más comúnmente aplicado para proteínas es el que emplea geles de poliacrilamida (PAGE = polyacrylamide gel electrophoresis) en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS). Esta técnica es conocida como SDS-PAGE. Para ello se prepara un gel en placa vertical. El SDS tiene la propiedad de unirse a las cadenas polipeptídicas en una proporción masa:masa constante (1,4 g SDS/g de proteína), de modo que en el complejo SDS-proteína la carga de la proteína queda enmascarada por la de las múltiples moléculas de SDS y ésta es proporcional al tamaño (n° de aminoácidos). Por lo tanto, en la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, la separación de proteínas se hace en función de la masa molecular. Para ello se compara la movilidad electroforética (R_f) de la proteína de peso molecular desconocido con el de proteínas de referencia de peso molecular conocido.

Por otro lado, la electroforesis bidimensional (2-DE) constituye un método altamente eficaz para separar mezclas complejas de proteínas, donde se puede aislar gran número de ellas en un mismo experimento (Pérez-Gordo, 2010). La separación se realiza en dos etapas consecutivas (Figura 4.1):

- En la primera de ellas - PRIMERA DIMENSIÓN - las proteínas se separan en función de su carga eléctrica a lo largo de un gel de poliacrilamida con un gradiente inmovilizado de pH (IPG). Cada proteína avanza en el campo eléctrico hasta alcanzar un valor de pH igual a su punto isoelectrónico (pI). Esta separación electroforética se denomina isoelectroenfoque (IEF).
- En una segunda etapa - SEGUNDA DIMENSIÓN - la separación de las proteínas está basada en la electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida o SDS-PAGE, en la que se separan las proteínas en función de su masa molecular en presencia del

detergente SDS. El SDS (dodecilsulfato de sodio) tiene la característica de desnaturizar por completo las proteínas.



Fuente: Pérez-Gordo, 2010

Figura 4.1 - Esquema de la electroforesis bidimensional. Las proteínas se separan mediante dos procesos secuenciales. La primera separación se basa en la carga eléctrica de la proteína y la segunda en el tamaño molecular.

Para que se pueda visualizar el resultado de estas dos electroforesis se lleva a cabo la tinción de las proteínas en gel, realizado posteriormente a la separación de las proteínas. Existen varios métodos de tinción de proteínas con diferentes características (sensibilidad, reproducibilidad, linealidad y homogeneidad) (Rabilloud, 2000). Las primeras técnicas de tinción usaban azul de Coomassie o nitrato de plata, aunque, la tinción en plata tiene alta sensibilidad y se utiliza bastante, su rango de detección lineal es inferior al de métodos de tinción desarrollados posteriormente. En la actualidad, se utilizan tinciones como el Coomassie G-250 o coloidal, que tiene una mayor sensibilidad que el convencional (R-250), o tinciones fluorescentes como el SYPRO Ruby (Pérez-Gordo, 2010).

Hasta la fecha no existen estudios de electroforesis bidimensional de las proteínas de semillas de judía de Tolosa y lenteja de la Armuña sometidas a cocción y germinación. Por lo tanto, este estudio permitirá analizar de manera más profunda la composición de las proteínas de leguminosas crudas y procesadas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- El principal objetivo de este capítulo es observar como los procesos de cocción y germinación afectan los niveles proteicos de judía de Tolosa y lenteja de La Armuña.

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Para el análisis de las proteínas es necesario que las muestras no contengan almidón. Como consecuencia se procede a tratar las muestras cocidas igual que en la preparación de RLA (Residuo Libre de Almidón), cuya metodología se explica detalladamente en el Capítulo 3.

La metodología descrita en el presente trabajo se basa en la publicación de Pérez-Gordo (2010), con algunas modificaciones.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Se disuelve la muestra (2,5 g de RLA de leguminosas) en matraces de 50 ml conteniendo 25 ml de tampón fosfato salino PBS (20 mM de NaH_2PO_4 , 20 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, pH 7,2). Se deja en agitación a 4 °C durante 18 horas. La mezcla es introducida en botes falcon de 50 ml, donde son centrifugados a 4700 rpm durante 30 minutos a 4 °C. El residuo sólido ("pellet") es almacenado a 4 °C, y el sobrenadante a -80 °C, hasta su posterior utilización. El sobrenadante se vuelve a centrifugar a 4700 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se recoge el sobrenadante en otro tubo de ensayo tipo falcon y el residuo de esta etapa es descartado. Se realiza una diálisis con membrana semipermeable MWCO 3,500 18 mm con bicarbonato de amonio 0,1 M. Previamente se deja la membrana en agua Mili-Q durante 10 min, para alcanzar las condiciones óptimas de la misma. Se realizan varios cambios del dializado (bicarbonato amonio 0,1 M) cada 4 horas. Al día siguiente, se recoge la muestra del interior de la bolsa de diálisis en tubos tipo falcon (50 ml), almacenándose a -80 °C, hasta su liofilización.

A la muestra liofilizada se añade 1,5 ml de PBS pH 7, se centrifuga a 3000 rpm durante 30 minutos. El residuo se descarta y se filtra el sobrenadante. El filtrado se almacena en tubos eppendorf en refrigeración a 4 °C.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Para calcular la concentración de proteínas presente en los extractos (mg/ml) se siguió el protocolo de Bradford (1976) utilizando el reactivo Coomassie Plus (Pierce). Para ello, la

muestra filtrada del apartado anterior se centrifuga (centrífuga minisein eppendorf) y se recoge 1 μ l de muestra, para la cuantificación de proteínas utilizando el kit de BioRAD (protocolo microplaca DC protein assay) que utiliza placa Varioskan Flash. Para ratificar los resultados también se aplicó una técnica de espectrometría y fluorescencia utilizando la tecnología del Nanodrop (Figura 4.2).



Figura 4.2 - Nanodrop utilizado para cuantificación de proteínas.

ELECTROFORESIS

Electroforesis unidimensional

Los geles de poliacrilamida actúan a modo de tamiz molecular retardando el movimiento de macromoléculas grandes mientras que permiten a moléculas más pequeñas moverse libremente, potenciando de esta forma la separación de las diferentes proteínas en función de su tamaño.

La electroforesis se llevó a cabo según el método de Laemmli (1970). Para la polimerización de los geles y el desarrollo de las electroforesis se utilizaron los sistemas Mini-Protean III (Bio-Rad) (Figura 4.3). Los marcadores de peso molecular utilizados son los Broad Range (Bio-Rad), que abarcan un intervalo de masas moleculares de 10 a 250 kDa.



Figura 4.3 - Mini-Protean III (Bio-Rad) utilizado para polimerización de los geles en la electroforesis.

Las concentraciones de acrilamida son del 14% (p/v) para el gel separador, y del 5% (p/v) para el gel concentrador:

- Gel separador: 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, Acrilamida 14% (p/v), SDS 10% (p/v), APS (persulfato de amonio) 10% (p/v) y TEMED 14%. El reactivo APS es un agente oxidante y el TEMED (N,N,N',N' tetrametiletilendiamina) es un agente reductor.
- Gel concentrador: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, Acrilamida 5% (p/v), SDS 10% (p/v), APS 10% (p/v) y TEMED 5%.

Las muestras se prepararon en tampón de carga de electroforesis [0,1 M Tris-HCl, pH 6,8, 4% (p/v) SDS, 20% (p/v) glicerol, 10% (p/v) 2-β-mercaptoetanol y 0,02% (p/v) azul de bromofenol] y, posteriormente, se desnaturalizaron calentando 5 minutos a 95 °C. Se cargó en cada pocillo una cantidad de proteína de 20 µg para un sistema de Bio-Rad. Los geles se corrieron en tampón de electroforesis [0,025 M Tris-HCl, pH 8,3, 0,192 M glicina y 0,1% (p/v) SDS], toda la noche a una intensidad 20 mA por gel hasta el gel concentrador y a partir de ahí a 30 mA por gel, en el sistema de Bio-Rad.

Electroforesis bidimensional (2D-SDS-PAGE)

Para la separación electroforética bidimensional, las muestras proteicas se sometieron a dos fases de separación: Isoelectroenfoque (primera dimensión) y PAGE-SDS (segunda dimensión).

Isoelectroenfoque (1ª dimensión)

Los extractos de leguminosa se solubilizaron en tampón de rehidratación {7 M urea, 2 M tiourea, 4% tampón CHAPS [10 mM ácido 3-(ciclohexilamino-1-propanosulfónico) pH 11, 10% (v/v) metanol], 20 mM DTT (ditiotreitól, un agente reductor) y 0,5% (v/v) de una mezcla de anfolitos (Bio-Lyte® 3/10 ampholyte, Bio-Rad)} hasta completar el volumen recomendado de carga en las tiras IPG: 125 µl para tiras de 7 cm, 300 µl para tiras de 11 cm. Para la primera dimensión se emplearon tiras de gel de poliacrilamida con gradientes de pH (tiras IPG, Immobiline™ DryStrip, GE Healthcare) de 3,3 mm de ancho, 0,5 mm de espesor, una longitud de 7 ó 11 cm, y con intervalos de pH de 3 - 8. El isoelectroenfoque se llevó a cabo en un sistema Protean IEF (Bio-Rad) (Figura 4.4).



Figura 4.4 - Sistema Protean IEF (Bio-Rad) utilizado para el isoelectroenfoque.

Primero se aplicó un programa de rehidratación activa, consistente en 12 h a 50 V, cubriendo las tiras con aceite mineral para evitar la evaporación de la muestra durante el proceso. Posteriormente, el programa de isoelectroenfoque (IEF) aplicado fue el siguiente: de 50 V a 300 V en 1 min, de 300 V a 1000 V en 30 min, de 1000 V a 5000 V en 1 h 30 min y 5000 V hasta acumular 29000 V finales. El protocolo se aplicó a una temperatura de 20 °C. Los geles en gradiente se calibraron utilizando la mezcla de proteínas contenidas en el kit IEF standard con un intervalo de pI 4,6 - 9,6 de Bio-Rad.

SDS-PAGE (2ª dimensión)

Previo a la segunda dimensión, se equilibraron las muestras durante 20 minutos con DTT e IAA (yodoacetamida), sucesivamente, en tampón de equilibrio [75 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M urea, glicerol 30% (v/v) y SDS 8% (p/v)].

La segunda dimensión se realizó en geles homogéneos SDS-PAGE al 14%, en los que sólo se polimeriza el "gel separador" y la tira se coloca directamente en contacto con la región superior de éstos. Los geles se corrieron en una cubeta de electroforesis Mini-protean III (BioRad) (Figura 4.3).

Tinción de geles SDS-PAGE

Tras la SDS-PAGE, se tiñeron los geles con azul de Coomassie (Figura 4.5) y se escanearon en un densitómetro GS-800 (BioRad).



Figura 4.5 - Geles SDS-PAGE en agitación con Azul de Coomassie.

4.4 RESULTADOS Y DISCUSIONES

Si se considera que se obtuvieron cerca de 3 ml de cada una de estas muestras, con el método empleado se obtuvo suficiente proteína para los experimentos planteados. Para verificar si las proteínas no se encuentran degradadas o determinar si no existen contaminantes, éstas se separaron en un gel bajo condiciones desnaturalizantes.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Los resultados de la extracción de proteínas de las distintas harinas de leguminosa se muestran en la Figura 4.6. Se observa que en las muestras crudas de judía (42 mg/ml) y lenteja (39 mg/ml) los valores son muy similares entre sí. Estos resultados son muy superiores a judía común (7 mg/ml) (Camacho-Espinoza y col., 2010).

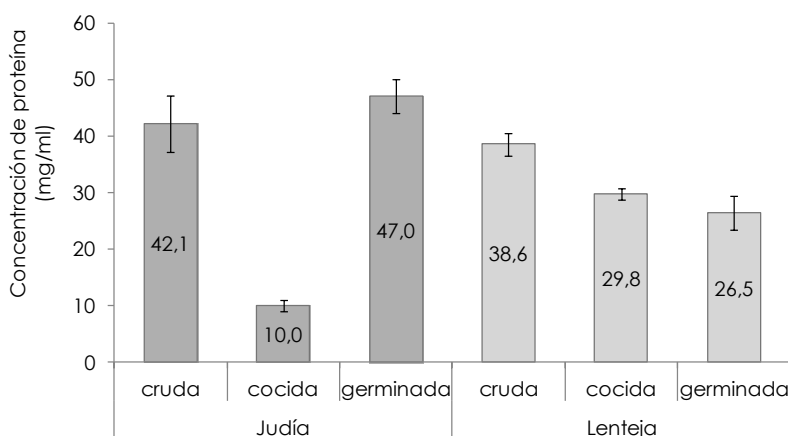


Figura 4.6 – Concentración de proteínas (mg proteína / ml extracto RLA) en leguminosas crudas y procesadas.

El proceso de cocción provoca una reducción en la concentración de proteínas en ambas leguminosas. En judía la reducción es drástica (76%), probablemente debido que esta muestra, en su etapa de preparación, presentó problemas con la extracción del almidón, siendo necesario extraerlo con sucesivos lavados de DMSO, lo que puede haber provocado una solubilización de proteínas y la consecuente pérdida de estas. En lenteja la reducción en la concentración de proteínas es más discreta (23%). Sin embargo, la germinación provoca diferentes cambios según la muestra estudiada, en judía se observa un ligero incremento (12%), a diferencia del comportamiento observado en la lenteja donde la germinación causa una reducción considerable (31%). El método empleado para preparación de la muestra (RLA) afecta la concentración proteica de judía y lenteja crudas y procesadas, como también el tipo de leguminosa analizada y el procesamiento empleado.

Analizando los valores de este método de cuantificación proteica a partir de un extracto de RLA se observa que la tendencia de los resultados es muy distinta al ensayo de determinación de proteínas a partir del contenido de nitrógeno descrito en el Capítulo 1, ya que este último es una estimación a partir del contenido de nitrógeno observado en la muestra de harina, expresado en g/100 g ms.

ELECTROFORESIS UNIDIMENSIONAL

Cuando comparamos el perfil proteico de los extractos de leguminosas crudas y procesadas (Figura 4.7), se observa una diferencia de composición de proteínas entre judía y lenteja. En las muestras crudas, se observan bandas de proteínas con mayor densidad en judía si se compara con la lenteja, sobre todo proteínas cuya masa

molecular se encuentra entre 37 y 50 kDa, y también próxima a 10 kDa. Asimismo, el extracto de lenteja cruda presenta mayor concentración de proteínas con masa molecular más alta (> 50 kDa), principalmente próximos a 100 kDa, como también proteínas con masa molecular muy bajas (< 15 kDa). Estos resultados son similares a los observados en la literatura para variedades de judía común (Camacho-Espinosa y col., 2010). De acuerdo con el trabajo de Urbano y col. (2005) las proteínas de la harina de guisante crudo exhibieron bandas con alta densidad, correspondientes a las proteínas de almacenamiento convicilina (70 kDa), vicilina (12-30-35 kDa), α -legumina (39 -40 kDa) y β -legumina (20-25 kDa).

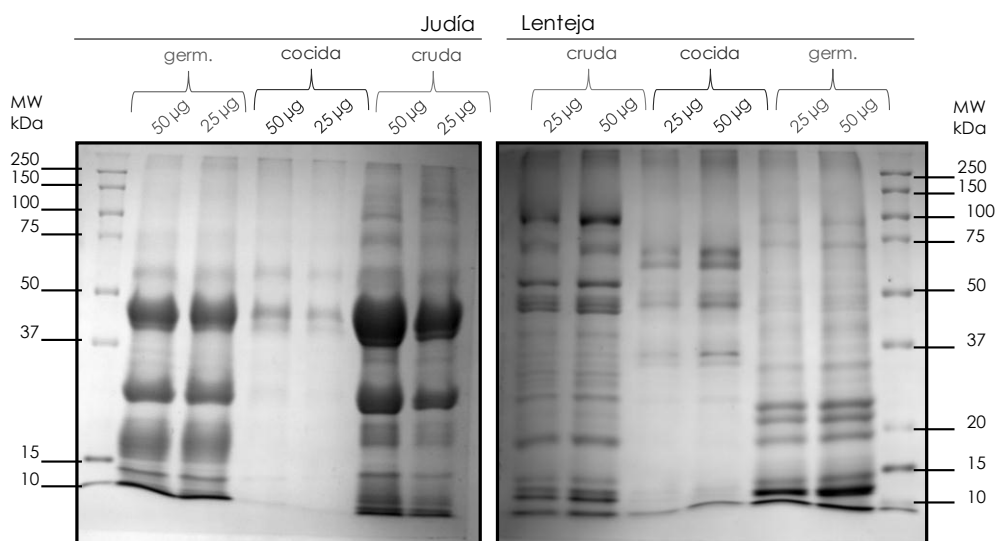


Figura 4.7 – Perfiles proteicos, separados por masa molecular, de extractos de leguminosas crudas y procesadas.

En los extractos de las muestras cocidas, se observa que la intensidad de las bandas, entendida como concentración de proteína, es visiblemente menor. En los extractos cocidos, cabe destacar, la presencia de proteínas entre 37 y 50 kDa, principalmente (Figura 4.7). Sin embargo, en el extracto de lenteja cocida se observa una mayor presencia de bandas de proteínas respecto a la judía cocida. De esta forma, se puede decir que el tratamiento con calor elimina las proteínas más termosensibles. Camacho-Espinosa y col (2010) trabajando con judía común afirmaron que las proteínas de masa molecular próximas a 50 kDa corresponden a familia de las faseolinas, mientras que las proteínas de masa molecular de 30 kDa pertenecen a la familia de las lectinas. De acuerdo con estas afirmaciones, se podría especular, en el presente trabajo, que el proceso de cocción reduce notablemente el contenido de proteínas de las familias de las faseolinas y lectinas (Van Dame y col., 1997).

Respecto a los extractos de las muestras de leguminosas germinadas, por un lado, se observa una pérdida de proteínas con masa molecular superior a 31 kDa respecto a las muestras crudas, y por otro lado, se aprecia un incremento en la concentración de proteínas cuya masa molecular es inferior a 31 kDa, en ambas leguminosas, principalmente en las proteínas de masa molecular entre 5 - 10 kDa. Por lo tanto, los procesos fisiológicos provocados por la germinación cambian el perfil proteico de leguminosas como judía de Tolosa y lenteja de La Armuña. Según el estudio de Urbano y col. (2005), la germinación de 2, 4 o 6 días condujo a la hidrólisis de las proteínas de guisante, que se refleja en la desaparición o pérdida de la densidad de las bandas polipeptídicas principales, junto con la aparición de una mancha de polipéptidos de menor peso molecular, que era particularmente evidente después de 6 días de la germinación. Estos resultados coinciden con el presente trabajo, donde se observa un aumento de la concentración de proteínas de menor peso molecular (< 20 kDa) en ambas leguminosas (Figura 4.7).

ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

Posteriormente a la electroforesis unidimensional, se realiza la separación 2D-PAGE-SDS, en que se aplica un barrido horizontal, donde en este caso es posible visualizar y diferenciar un mayor número de proteínas o grupos proteicos (Figura 4.8). De acuerdo con los resultados se aprecia que la mayoría de las proteínas de las muestras de judía presentan mayor solubilidad a pH más ácido (inferior a 5,5), mientras que en las muestras de lenteja a pH próximo al neutro (entre 6 y 8). En el caso de la muestra cruda de judía, se observan distintos spots entre 10 y 75 kDa con alta concentración proteica, mientras que en lenteja cruda la densidad de los spots son más discretos.

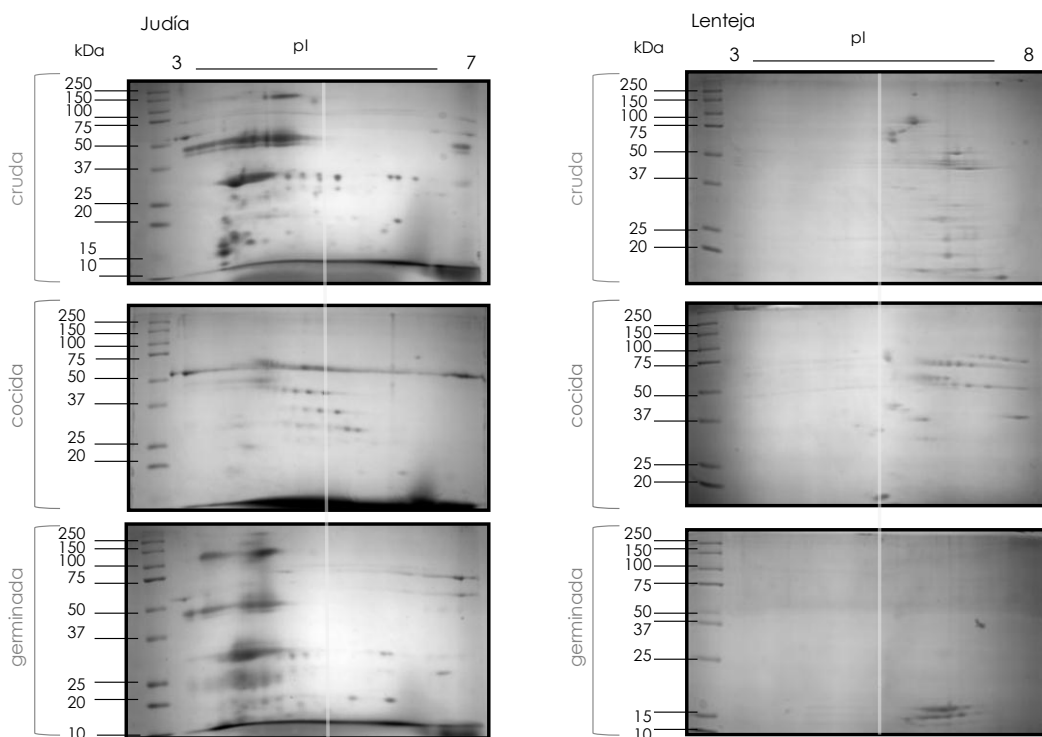


Figura 4.8 – Electroforesis bidimensional de extracto de leguminosas crudas y procesadas en un intervalo de pI de 3 a 7 para muestras de judía, y 3 a 8 para muestras de lenteja.

El tratamiento térmico provoca una desnaturalización de las proteínas, como se indica en la literatura (Sirtori y col., 2012). Según estos autores, en los extractos de proteína de guisantes la vicilina se desnaturaliza a bajas temperaturas (75 °C), mientras que la legumina a temperaturas más altas (100 °C). Si en las muestras de judía y lenteja crudas, del presente estudio, se encontraron proteínas como vicilina y legumina, éstas probablemente se desnaturalizarían en el proceso de cocción, ya que la temperatura de este proceso estuvo en torno a 100 °C. Esta desnaturalización también fue observada en proteínas de lupino (Sirtori y col., 2010) y en proteínas de soja (Shand y col., 2007). Sin embargo, en el presente trabajo, se observa que con la cocción hay presencia de proteínas estables térmicamente, principalmente a 37 y 75 kDa, en ambas leguminosas.

A su vez, en la germinación se observa una presencia de proteínas cuyo punto isoeléctrico es más bajo, respecto a la muestra cruda, en ambas leguminosas. Además, se aprecia una mayor concentración de proteínas de menor masa molecular en judía (< 37 kDa) y en lenteja (< 20 kDa) germinadas. De ahí que, la germinación cambia el perfil proteico de las leguminosas, que pudiendo ser debido a la actividad enzimática desencadenada por la germinación.

4.5 CONCLUSIONES PARCIALES

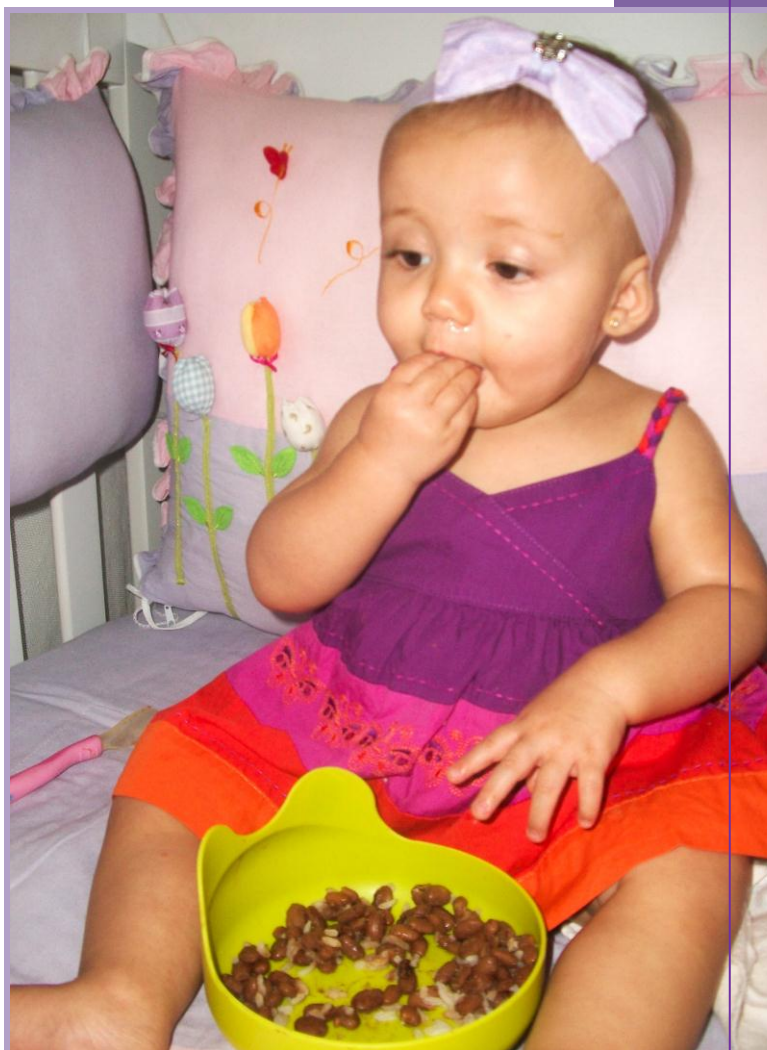
- ✓ La cocción modifica el contenido y composición de las fracciones proteicas, observándose que la intensidad de las bandas es visiblemente menor. El tratamiento térmico provoca la desnaturalización de parte de las proteínas, detectándose la disminución de la densidad de los spots en la electroforesis 2D, tanto en judía como en lenteja. Sin embargo, la cocción no afecta algunas proteínas, especialmente aquellas con masa molecular entre 37 y 75 kDa, que serían consideradas térmicamente estables.
- ✓ Los procesos fisiológicos provocados por la germinación cambian el perfil proteico de las leguminosas del presente estudio, y provocan un aumento de la concentración de proteínas de menor peso molecular y menor potencial isoelectrico.

"Sueña todo lo que quieras... que los sueños son el alimento del alma, como la comida lo es del cuerpo."

Anónimo

Capítulo 5 - INFLUENCIA DE DIFERENTES PROCESOS SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE HARINAS DE LEGUMINOSAS

5



Carolina Alencar Cavalcanti

Capítulo 5 - INFLUENCIA DE DIFERENTES PROCESOS SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE HARINAS DE LEGUMINOSAS

5.1 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

Los compuestos fenólicos, en las leguminosas, representan un grupo importante y diverso de elementos bioactivos (Amarowicz y Pegg, 2008; Dueñas y col., 2009), que dependen de la especie y variedad (López-Amorós y col., 2006). Estos compuestos son de naturaleza no flavonoidea (ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, tanto libres como unidos a otras moléculas) y de naturaleza flavonoidea (procianidinas, flavonoles, flavanoles, isoflavonas, flavonas, antocianos, etc).

Se atribuyen numerosas actividades biológicas a los compuestos fenólicos, tales como ser factores de prevención y de protección frente a diversas enfermedades, así como presentar un importante carácter antioxidante debido a su capacidad de captación de radicales libres, por lo que se consideran beneficiosos para el mantenimiento y recuperación de un estado saludable (Villegas y col., 2008).

Se denomina antioxidantes a todos aquellos elementos que tienen como función eliminar del organismo los radicales libres que se producen como resultado de la oxidación celular inducida por el oxígeno activo, siendo la causa principal del aumento de la incidencia de enfermedades en los seres vivos.

Actualmente, se surge que el consumo de legumbres está asociado con un menor riesgo de padecer ciertas enfermedades, tales como enfermedades cardiovasculares, cáncer y diabetes, debido a la presencia de compuestos antioxidantes como los compuestos fenólicos capaces de reducir el daño oxidativo (Amarowicz y Pegg, 2008; Aguilera y col., 2010). De esta forma, diversos autores (Dueñas y col., 2002, 2003, 2004, 2006, 2009; Lin y Lai, 2006; Martínez-Villaluenga y col., 2009; Martín-Cabrejas y col., 2009; Xu y Chang, 2009) han estudiado la actividad antioxidante de diferentes tipos de extractos de leguminosas y el contenido de antioxidantes presentes en legumbres sometidas a diferentes procesos tecnológicos (López-Amorós y col., 2006; Xu y col., 2007).

En las primeras etapas del procesado pueden ponerse en contacto los polifenoles con los polisacáridos de las paredes celulares. Ésto podría tener repercusiones importantes sobre la composición y las propiedades de los alimentos. Por tanto, para comprender mejor los cambios que se producen durante la cocción y germinación en la textura y en las propiedades nutricionales de la fibra alimentaria, es preciso llevar a cabo

investigaciones sobre la estructura de los polisacáridos y los componentes asociados a ellos, como son los polifenoles (Lin y Lai, 2006).

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar los cambios producidos en la fracción fenólica y en la capacidad antioxidante como consecuencia del tratamiento térmico de cocción y del procesamiento de germinación, realizado sobre las harinas de leguminosas objeto de estudio.

5.3 METODOLOGÍA

EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Para la determinación de los compuestos fenólicos se realiza una extracción previa, y sobre los extractos se lleva a cabo la determinación colorimétrica de los compuestos fenólicos totales y la determinación de la capacidad antioxidante.

Según el método descrito por Dueñas y col. (2004), con algunas modificaciones, los compuestos fenólicos se extraen a partir de 0,5 g ($\pm 0,0001$ g) de muestra de harina liofilizada que se disuelven en 2,5 ml de una mezcla de metanol-HCl (0,1%)/agua (80:20, v/v). La mezcla es agitada durante 15 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación, se centrifuga a 4000 rpm durante 10 minutos. El residuo es descartado y el sobrenadante se filtra mediante una malla de nylon de 100 μ m y se almacena a -20 °C (máximo 1 semana).

CUANTIFICACIÓN DE LOS POLIFENOLES TOTALES

La determinación de los polifenoles totales es una valoración global del contenido de polifenoles, utilizando para ello un método basado en el carácter reductor de los mismos. La cuantificación se realiza por la medida del complejo azul formado por los polifenoles con una mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico, conocida como reactivo de Folin-Ciocalteu, utilizando una curva patrón de ácido gálico (Singleton y Rossi, 1965).

En tubos de ensayo se añaden sucesivamente: 3 ml de agua mili-Q, 50 μ l de extracto de muestra y 250 μ l de Folin-Ciocalteu, se agita en un vortex durante 10 segundos y se deja en reposo 3 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Pasados los 3 minutos se añaden 750 μ l de carbonato sódico 20% y 950 μ l de agua mili-Q. Los tubos de ensayo con la mezcla de extracto de muestra y los tubos con patrones de ácido gálico (concentraciones de 0 - 500 mg/l) se dejan en reposo 2 horas en oscuridad a

temperatura ambiente. La absorbancia se mide a 760 nm y el resultado se expresa como miligramos equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de materia seca.

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Con el mismo extracto anteriormente descrito se determina la capacidad antioxidante, utilizando para ésto dos métodos: DPPH [2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl] y FRAP ("ferric reducing antioxidant power"). Los métodos para determinar la capacidad antioxidante se pueden dividir en dos categorías, los basados en la reacción de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT) y los basados en las reacciones de transferencia de un sólo electrón (ET). Los métodos basados en transferencia de un sólo electrón involucran una reacción redox con el oxidante como un indicador del final de la reacción, mientras que los métodos HAT, generalmente, usan un compuesto generador de radicales libres, un indicador molecular oxidable y un antioxidante (Huang y col., 2005). En el presente trabajo se emplean dos métodos HAT, conocidos por FRAP y DPPH. Como antioxidante sintético de referencia se utiliza el Trolox en ambos casos.

El Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácidocarboxílico) es un antioxidante como la vitamina E. Debido a las dificultades en la medición de los componentes individuales de antioxidantes de una mezcla compleja (como los frutos), la equivalencia Trolox se utiliza como punto de referencia para la capacidad antioxidante de una mezcla.

Método DPPH

Para la determinación de la capacidad antioxidante se usó el método conocido como DPPH desarrollado por Brand-Williams y col. (1995) con algunas modificaciones. El método consiste en que los compuestos con capacidad antioxidante reducen el radical DPPH capturando así radicales libres de la muestra. El radical DPPH tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, pero se decolora hacia amarillo pálido cuando reacciona con una sustancia antioxidante. Esta propiedad permite el control visual de la reacción, y el número de radicales iniciales pueden ser contados a partir del cambio en la longitud de onda de 515 a 520 nm. Se puede describir el procedimiento en 3 partes:

1º) Control - consiste en medir la absorbancia del DPPH (sin la presencia de ninguno tipo de antioxidante); para esto se añade 50 µl de metanol en una cubeta de cuarzo que contenga 1,95 ml de la disolución de DPPH 25 mg/l, se agita inmediatamente en vortex y se mide la absorbancia (longitud de onda a 515 nm) cada minuto durante 30 minutos, hasta que la absorbancia se mantenga constante (0,690 - 0,740).

2º) Patrones - bajo las mismas condiciones del control, se procede con la solución de Trolox (300-1000 µM). Entre la escala de concentraciones del patrón (300, 400, 500,

600, 750 y 1000 μM de Trolox) se observa cuál de ellas presenta absorbancia constante que corresponde al 30 - 50% de la absorbancia del control, que en este caso oscila entre 0,190 - 0,250. Una vez que se encuentre la concentración del patrón que presente absorbancia constante entre 0,190 y 0,250 (que en este caso fue con 750 μM de Trolox) se procede a medir la curva de calibrado, diluyendo la madre de Trolox (750 μM) en $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ y $\frac{3}{4}$.

- 3º) Muestras - con los extractos de las muestras se procede de igual forma que con el patrón de Trolox, primero hay que encontrar la dilución donde presente una absorbancia constante entre 0,190 y 0,250; en este caso el ensayo se extiende a 2 horas de incubación, como mínimo. La dilución encontrada para cada muestra se muestra en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1 – Diluciones de las muestras de leguminosas que presentan absorbancia constante en ensayo de 2 horas de incubación.

Muestra	Cruda	Cocida	Germinada
Judía	3:10 (100 min)	4:5 (55 min)	2:3 (45 min)
Lenteja	2:5 (40 min)	3:4 (60 min)	5:6 (50 min)

Entre paréntesis el tiempo en que la absorbancia empieza a ser constante.

Una vez que se obtenga la dilución cuya absorbancia se encuentre constante entre 0,190 y 0,250 (durante 2 horas de incubación), se diluye ésta a $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ y $\frac{3}{4}$, para que se forme una gráfica de cinética de DPPH para cada una de las muestras.

Cálculos:

- a) Se calcula el porcentaje que representa cada absorbancia observada en las muestras, frente al control (absorbancia de DPPH sin presencia de antioxidantes):

$$\% \text{ de reacción antioxidante} = (\text{abs Control} - \text{abs muestra o patrón}) \times 100 / \text{abs control}$$

- b) Con estos datos se diseña una gráfica para encontrar la ecuación de la recta ($Y = ax + b$), donde: Y es el porcentaje de la actividad antioxidante de la muestra que reaccionan con DPPH, frente al control; x es la dilución utilizada. Se sustituye la Y por 50, pues se busca la concentración donde se reduce al 50% el DPPH. Resultado expresado en: μmol de Trolox/litro de DPPH (25 mg/l) = IC₅₀ Trolox.
- c) Con las muestras se realiza el mismo procedimiento, hasta encontrar el valor en litro de extracto /litro de DPPH, considerando la dilución madre de cada muestra. El resultado es el IC₅₀ muestra.
- d) Se divide el IC₅₀ Trolox / IC₅₀ muestra. El resultado se expresa en μmol Equivalente Trolox/litro de extracto de muestra. Se multiplica por el volumen de extracto inicial (2,5

ml) y se divide por la cantidad de muestra utilizada para la extracción. El resultado se expresa en: $\mu\text{mol ET/g ms}$. ET = equivalente en Trolox.

Método FRAP

El método FRAP fue elegido por ser un procedimiento sensible, rápido y que estima directamente la capacidad de los antioxidantes de una muestra (Dini y col., 2008). El método FRAP (Benzie y Strain, 1996) es un método colorimétrico que se basa en la formación de un complejo coloreado ferroso-tripiridiltriazina (TPTZ) que se produce cuando el ión férrico (Fe^{+3}) se reduce a ión ferroso (Fe^{+2}) a pH bajo, desarrollando un intenso color azul con una absorción máxima a 593 nm. Con este método se determina la capacidad de reducción férrica que tiene una muestra.

TPTZ-Fe III (incoloro) \rightarrow TPTZ-Fe II (azul)

pH= 3,6; T° = 37 °C

Para este método se usan las siguientes disoluciones:

Tampón acetato 300 mM pH 3,6: 0,8 g de $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$, 8 ml de $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ y se enrasa hasta 500 ml con agua destilada, se mide y se ajusta a pH 3,6.

TPTZ (2, 4, 6-tripiridil-S-triazina) 10 mM en HCl 40 mM: 31 mg de TPTZ se disuelven y enrasan en 10 ml de HCl 40 mM. Esta disolución se tiene que usar dentro de las dos horas posteriores a su preparación.

Cloruro de hierro (III) 20 mM: 54 mg de cloruro de hierro se disuelven y enrasan en 10 mL de agua desionizada. Esta disolución se tiene que usar dentro de las dos horas posteriores a su preparación.

Solución de trabajo FRAP (1:1:10): 1 ml de la disolución de TPTZ y 1 ml de la disolución de cloruro de hierro (III) se añaden a 10 mL de tampón acetato. Esta disolución se tiene que usar dentro de las dos horas posteriores a su preparación.

En tubos de ensayo se añade 50 μl de extracto de muestra de harina de leguminosa, se añade 1,5 ml de disolución de trabajo FRAP (3 ml), se deja reaccionar durante 4 minutos para desarrollar el color y finalmente se mide la absorbancia a 593 nm en cubetas de cuarzo. La curva de calibrado se prepara de igual forma que con las muestras, utilizando para ésto diferentes concentraciones de Trolox (0 - 750 μM). Los resultados se expresan en $\mu\text{mol ET / g}$ de materia seca. ET = equivalente en Trolox.

5.4 RESULTADOS Y DISCUSIONES

COMPUESTOS FENÓLICOS

El contenido total de compuestos fenólicos en harinas de leguminosas, tanto crudas como procesadas, se refleja en la Tabla 5.2. Se observa que lenteja cruda (1,5 mg EAG/g ms) presenta un valor muy próximo a la judía cruda (1,4 mg EAG/g ms). Estos resultados son similares a los encontrados en varios tipos de soja (1,5-1,8 mg EAG/g ms) (Xu y col., 2007), pero son inferiores a los resultados observados en judía Cannellini (2,1 mg EAG/g ms), judía Pinta y lenteja Pardina (5,4 mg EAG/g ms) (Aguilera, 2009), judías negras y Pinta (7,0 mg EAG/g ms) (Xu y Chang, 2009).

Tabla 5.2 – Contenido de polifenoles totales (mg EAG/g ms) en leguminosas crudas y procesadas.

Muestra	Judía	Lenteja
Cruda	1,4 ± 0,1 ^b	1,5 ± 0,1 ^b
Cocida	0,8 ± 0,1 ^a	1,5 ± 0,0 ^b
Germinada	1,4 ± 0,1 ^b	1,3 ± 0,0 ^a

Los valores son medias ± DE, n=3. Las medias dentro de una columna y leguminosa con diferente superíndice son significativamente diferentes para P<0,05. EAG = equivalente en ácido gálico.

El procesado provoca diferentes comportamientos en el contenido de polifenoles totales en las leguminosas estudiadas. Mientras que la cocción disminuye el contenido de polifenoles en judía (43%), en lenteja no se observan cambios significativos. Otros autores también observan reducciones cuando las leguminosas son sometidas a cocción (Ramakrishna y col., 2006; Aguilera, 2009; Xu y Chang, 2009). La reducción del contenido de polifenoles observado en la cocción puede ser debido bien a la unión establecida entre los polifenoles con otros compuestos como proteínas, o bien, a las alteraciones en la estructura química de los polifenoles que no pueden ser extraídos e identificados por los métodos actualmente disponibles (Davis, 1981). Sin embargo, otros procesos térmicos como el tostado en piel de almendras y cacahuetes aumentan el contenido de polifenoles totales debido, posiblemente, a la degradación de diversas estructuras fenólicas, como proantocianidinas altamente polimerizadas y de baja extractabilidad (Yu y col., 2006) y flavonoles glicosilados (Garrido y col., 2007), y también al aumento de la extractabilidad fenólica debido a la destrucción de las estructuras celulares como las paredes celulares (Dewanto y col., 2002).

La germinación, en ambas leguminosas, no provoca cambios significativos en cuanto al contenido de polifenoles totales. Según López-Amorós y col. (2006) los cambios metabólicos parecen verse afectados por el período de germinación y por el tiempo de

exposición a luz. Autores como Lin y Lay (2006) también observaron que dependiendo del tipo de leguminosa estudiada, los valores de polifenoles totales resultan diferentes. Estos autores observaron incrementos en muestras de soja común con 4 días de germinación, pero en muestras de variedades de soja negra y *Vigna* spp. se observa una reducción al 4º día, observándose un incremento de polifenoles con el aumento de días de germinación. Estas relaciones corroboran los resultados obtenidos por Fernández-Orozco y col. (2008) y Dueñas y col. (2009) para otras leguminosas. Esta gran variación en cuanto al comportamiento de los componentes fenólicos podría ser explicada por el complejo metabolismo bioquímico de las semillas durante el proceso germinativo (Dueñas y col., 2009). Las enzimas endógenas de las leguminosas se activan durante la germinación provocando diferencias en las variaciones de la composición química de judía y lenteja. Dichas enzimas, como las hidrolasas y polifenoloxidasas, están directamente relacionadas con los compuestos fenólicos ya que su actividad aumenta durante la germinación, aunque de una manera diferente, dependiendo del tipo de leguminosa (Rao y Deosthale, 1987).

Tras los resultados obtenidos se puede decir que judía de Tolosa y lenteja de La Arnuña presentan bajos contenidos en polifenoles totales, comparado con otras leguminosas, y que el procesamiento provoca cambios discretos y de forma diferente en cada caso.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Los compuestos fenólicos, por sus características estructurales, tienen la facilidad de captar radicales libres, propiedad que les aporta actividad antioxidante. En general, esta actividad es proporcional al contenido de compuestos fenólicos presentes en los extractos de muestras (Dueñas y col., 2009).

Entre todos los métodos que existen para la determinación de la capacidad oxidante, los métodos DPPH y FRAP fueron seleccionados para este estudio porque se tratan de métodos muy sensibles, rápidos y económicos (Santas y col., 2008; Benítez, 2011).

Método DPPH

Los resultados obtenidos en las leguminosas objeto de estudio se encuentran reflejados en la Tabla 5.3. Se aprecia que las muestras crudas presentan capacidades antioxidante similares (3,8 $\mu\text{mol ET/g ms}$). Estos resultados son próximos a muestras crudas de altramuza (3,1 $\mu\text{mol ET/g ms}$) (Martínez-Villaluenga y col., 2009) y quinoa dulce (2,8 $\mu\text{mol ET/g ms}$) (Dini y col., 2010), mientras que son superiores a otras leguminosas como guisantes amarillos y verdes (1,5 - 1,9 $\mu\text{mol ET/g ms}$) y soja amarilla (1,2 $\mu\text{mol ET/g ms}$) (Xu y col., 2007). Otros autores observaron valores superiores a los del presente trabajo, como en el

caso de judías comunes (18,4 $\mu\text{mol ET/g ms}$) (Xu y col., 2007; Xu y Chang, 2009) y en diferentes tipos de lenteja (19,5 $\mu\text{mol ET/g ms}$) (Xu y col., 2007).

Tabla 5.3 – Capacidad antioxidante (EC_{50}) ($\mu\text{mol ET/g ms}$) en leguminosas crudas y procesadas, según el método DPPH.

Muestra	Judía	Lenteja
Cruda	3,9 \pm 0,1 ^c	3,7 \pm 0,1 ^b
Cocida	2,5 \pm 0,1 ^a	4,1 \pm 0,0 ^c
Germinada	3,0 \pm 0,1 ^b	2,7 \pm 0,1 ^a

Los valores son medias \pm DE, n=3. Las medias dentro de una columna y leguminosa con diferente superíndice son significativamente diferentes para $P < 0,05$. EC_{50} = cantidad de compuestos antioxidantes necesarios para reducir el DPPH en 50%. ET = Equivalente en Trolox.

Respecto al procesado, se observan diferentes comportamientos en cuanto al contenido de antioxidantes en cada una de las leguminosas. La cocción proporciona una reducción en la capacidad antioxidante de la judía (36%), mientras que en la lenteja se aprecia un ligero incremento de esta actividad (11%). En la bibliografía (Aguilera, 2009; Xu y Chang, 2009; Dini y col., 2010) se observan reducciones de la capacidad antioxidante cuando las leguminosas son sometidas a un tratamiento térmico. Los cambios en la capacidad antioxidante experimentados durante la cocción podrían ser atribuidos principalmente a dos factores, uno de ellos, la lixiviación de compuestos fenólicos al agua de cocción, y el otro, la degradación o formación de nuevos compuestos. En la bibliografía se han encontrado reducciones durante un proceso de cocción realizado bajo presión, en el caso de la lenteja común (11-16% de reducción) y de la judía común (30-43%) (Xu y Chang, 2008a, 2008b). Ésto justifica el comportamiento de judía de Tolosa cocida, pero en cuanto al incremento de la actividad antioxidante observado en la muestra de lenteja cocida, éste se puede deber a la formación de compuestos con altas propiedades antioxidantes o debido a la formación de productos de Maillard, los cuales poseen actividad antioxidante (Manzocco y col., 2002).

El proceso de germinación también provoca la reducción de la capacidad antioxidante en ambas leguminosas: 23% en judía y 27% en lenteja. No obstante, en la literatura se encuentran artículos que describen una tendencia al incremento de la actividad antioxidante cuanto más tiempo permanece la muestra germinada (Lin y Lai, 2006; Fernandez-Orozco y col., 2008, Dueñas y col., 2009). Según López-Amorós y col., (2006) los días de germinación y la presencia de luz afectan a las leguminosas de manera distinta. De esta forma, estos autores observaron que en muestras de guisantes y judías variedad La Granja tienen reducida su actividad antioxidante en el sexto día de germinación; sin

embargo, un comportamiento contrario ocurre en las lentejas Castellana, ya que tiene lugar un incremento de la actividad antioxidante en las muestras germinadas.

Estos resultados sugieren la posible presencia de otros compuestos antioxidantes además de compuestos fenólicos (López-Amorós y col., 2006), como algunas vitaminas, ácido fítico y carotenoides en diferentes concentraciones (Sies y col., 1992; Prodanov y col., 1998; Atienza y col., 1999) que pueden afectar a la capacidad antioxidante de las muestras. Estos compuestos pueden ejercer un efecto sinérgico entre ellos y conjuntamente con los compuestos fenólicos, pudiendo ser responsables de las diferencias observadas en cuanto a la capacidad antioxidante de las leguminosas estudiadas.

Debido a que el contenido de compuestos fenólicos puede tener influencia en la capacidad de captación de radicales libres y por lo tanto, en la actividad antioxidante, se lleva a cabo un análisis de regresión entre estos parámetros. Según los cálculos se observa una relación directa entre el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante (método DPPH) en ambas leguminosas. En las muestras de judía la relación es menos significativa ($r = 0,60$; $P < 0,01$) que en las muestras de lenteja ($r = 0,92$; $P < 0,01$), lo que indica que la actividad antioxidante de leguminosas, principalmente lentejas, está altamente correlacionada con el contenido de estos compuestos fenólicos, indicando que cuanto mayor es el contenido de polifenoles totales mayor será la actividad antioxidante.

Método FRAP

Respecto a los resultados en muestras crudas (Tabla 5.4) se aprecia que la lenteja presenta valores superiores ($7,3 \mu\text{mol ET/g ms}$) a la judía ($6,5 \mu\text{mol ET/g ms}$). Los resultados son próximos a muestras crudas de quinoa amarga ($8,7 \mu\text{mol ET/g ms}$), y superiores a muestras de quinoa dulce ($2,5 \mu\text{mol ET/g ms}$) (Dini y col., 2010).

Tabla 5.4 – Capacidad antioxidante ($\mu\text{mol ET/g ms}$) en leguminosas crudas y procesadas, según el método FRAP.

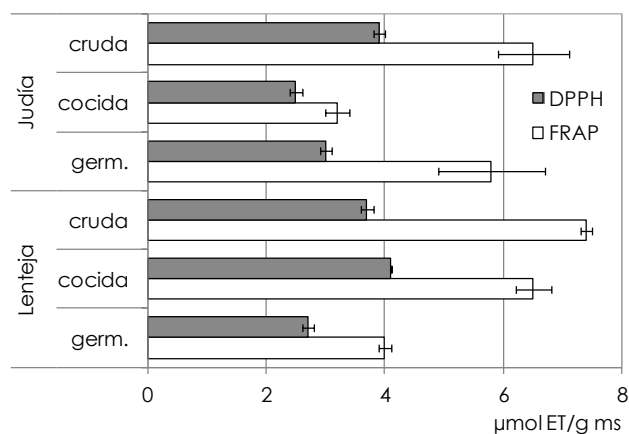
Muestra	Judía	Lenteja
Cruda	$6,5 \pm 0,6^b$	$7,3 \pm 0,1^a$
Cocida	$3,2 \pm 0,2^a$	$6,5 \pm 0,3^b$
Germinada	$5,8 \pm 0,9^b$	$4,0 \pm 0,1^a$

Los valores son medias \pm DE, $n=3$. Las medias dentro de una columna y leguminosa con diferente superíndice son significativamente diferentes para $P < 0,05$. ET = Equivalente en Trolox.

El procesamiento térmico provoca una notable reducción en la muestra de judía cocida (51%), mientras que en lenteja cocida la reducción es menos acentuada (11%). La disminución en la actividad antioxidante también se observa en otros trabajos (Aguilera, 2009; Xu y Chang, 2009). La germinación también reduce la actividad antioxidante en judía (11%) y en lenteja (45%) utilizando el método FRAP. Estos cambios apreciados en los procesados probablemente se deben a pérdidas de otros compuestos capaces de reducir radicales libres.

Se aprecia una relación directa entre el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante (método FRAP), de acuerdo con el análisis de correlación entre estos parámetros. En las muestras de judía ($r = 0,96$; $P < 0,01$) y lenteja ($r = 0,93$; $P < 0,01$) existe una alta relación entre la actividad antioxidante y el contenido total de polifenoles. De esta forma cuanto mayor sea el contenido de polifenoles mayor será la capacidad de retener radicales libres en muestras de leguminosas.

En resumen: el método FRAP es más sencillo que el DPPH y es igualmente eficaz a la hora de medir la capacidad antioxidante de una muestra. Probablemente, la razón para que los valores más bajos se aprecien en el método DPPH (Figura 5.1) se debe a la presencia de compuestos no reactivos respecto al radical libre DPPH (Przybylski y col., 1998). Esta diferencia entre los resultados para los dos métodos empleados también fue observada por Dini y col. (2010).



ET = Equivalente en Trolox.

Figura 5.1 – Comparación entre los resultados del método DPPH y FRAP (μmol ET/g ms) en leguminosas crudas y procesadas.

5.5 CONCLUSIONES PARCIALES

- ✓ La judía de Tolosa y lenteja de La Armuña presentan bajos contenidos en polifenoles totales, comparado con otras leguminosas.
- ✓ En general el procesamiento térmico disminuye el contenido de polifenoles totales, mientras que la germinación disminuye la capacidad antioxidante en ambos métodos (DPPH y FRAP). Se observa una relación directa entre el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante.

" Que la comida sea tu alimento y el alimento tu medicina."

Hipócrates

Capítulo 6 - EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES HIPOGLUCÉMICAS EN HARINAS DE LEGUMINOSAS PROCESADAS

6



Isaac de Almeida Luzirão

Impacto del procesamiento sobre la pared celular y las propiedades
hipoglucémicas y tecnofuncionales | Thaise Rachel Sarmento | 2012

Capítulo 6 - EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES HIPOGLUCÉMICAS EN HARINAS DE LEGUMINOSAS PROCESADAS

6.1 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

Además de la función bien conocida de la fibra alimentaria para reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, el cáncer de colon y la obesidad (Slavin, 2001; Rosamond, 2002), un consumo adecuado de fibra también puede reducir la respuesta glucémica en las personas con diabetes (Nishimune y col., 1991; Berger y Venhaus, 1992; Gourgue y col., 1992). La fibra alimentaria tiene la capacidad de adsorber diferentes sustancias, como las sales biliares y la glucosa que repercuten en el metabolismo del colesterol y en el control de la diabetes, respectivamente (Escalada-Pla y col., 2007). Además, el efecto beneficioso de la fibra sobre la reducción de los niveles de glucosa en sangre también se podría deber a la disminución de la respuesta a la insulina (Jarvi y col., 1999).

Para evaluar el efecto hipoglucémico de la fibra alimentaria se han propuesto varios mecanismos que buscan, entre otros, retardar la velocidad de la digestión de los polisacáridos en el estómago, reducir la velocidad del contenido del estómago al duodeno (vaciado gástrico), disminuir la velocidad de difusión de diversos azúcares simples en el intestino delgado, reducir la velocidad de hidrólisis de los polisacáridos en el intestino delgado superior y disminuir la velocidad de absorción de monosacáridos por las células epiteliales en el íleon y yeyuno superior (Nishimune y col., 1991). Sin embargo, la eficacia de la fibra para controlar la hiperglucemia depende de su composición, origen y del procesamiento al que haya sido sometida (Borner y col., 1997).

Ou y col. (2001) afirman que es posible la reducción de los niveles glucosa sérica postprandial utilizando fibra alimentaria. Está ampliamente demostrado que el incremento en el consumo de fibra disminuye la respuesta glucémica en diabéticos (Nishimune y col., 1991; Berger y Venhaus, 1992). La fibra alimentaria puede afectar el metabolismo de la glucosa por lo menos a través de tres vías: 1) aumentando la viscosidad del contenido del intestino delgado y retrasando la difusión de la glucosa, 2) evitando la difusión de la glucosa adsorbida y 3) inhibiendo la actividad α -amilasa y posponiendo la liberación de glucosa del almidón (Moron y col., 1989; Flourie, 1992; Gourgue y col., 1992; Ou y col., 2001).

Las fibras solubles e insolubles en agua tienen diferentes efectos sobre el organismo humano; ambas fracciones contienen ácidos urónicos, que presentan la posibilidad de reducir las concentraciones de glucosa postprandial a nivel sanguíneo (Wolever, 1990;

López y col., 1996). En este sentido, se han encontrado estudios en los que la concentración de glucosa en sangre se redujo más del 50% en hombres sanos con una dieta alta en fibra al cabo de 30-70 minutos tras la ingesta (Liljeberg y col., 1996). Sin embargo, la eficacia de la fibra alimentaria en el control de la hiperglucemia generalmente está afectada por su composición, origen y por los tratamientos a los que fue sometida (Nishimune y col., 1991; Bornet y col., 1997). Wolever (1990) afirmó que los alimentos ricos en fibra soluble no producían necesariamente un descenso de la glucosa sanguínea, mostrándose los ácidos urónicos de la fibra insoluble más relacionados con este índice. En este sentido, Flourie (1992) demostró que las fibras insolubles podrían retardar la utilización y la absorción de carbohidratos, ayudando en el control del nivel de glucosa sérica postprandial. Esta perspectiva es ligeramente diferente a lo establecido tradicionalmente en donde la fibra soluble dificulta la difusión de glucosa y pospone la digestión y absorción de carbohidratos, lo que provocaría una reducción de la glucosa postprandial en sangre (Yokoyama y col., 1997).

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos del presente trabajo son:

- evaluar el potencial hipoglucémico de fibras (RLA) de leguminosas;
- investigar el impacto que tienen los procesados (cocción y germinación) en las propiedades hipoglucémicas de judía de Tolosa y lenteja de La Armuña;
- comparar las propiedades hipoglucémicas de la fibra (RLA) de leguminosas con las propiedades hipoglucémicas de la celulosa.

6.3 MATERIALES Y MÉTODOS

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Para eliminar la interferencia de la glucosa libre en las determinaciones analíticas es necesario realizar una extracción del almidón y de la glucosa libre presentes en las harinas de judía y lenteja crudas y procesadas, obteniéndose los correspondientes concentrados de fibra (RLA – Residuo Libre de Almidón). La metodología para la obtención del RLA está explicada en el Capítulo 3.

En el presente capítulo se evalúa la interferencia del RLA de las muestras de leguminosa en la capacidad de adsorción de glucosa y en el efecto de la difusión de la misma, así como sobre la actividad α -amilasa y la digestibilidad del almidón. Paralelamente se realizan las mismas determinaciones para celulosa (utilizada como fibra-control) y para el control (análisis realizado en ausencia de cualquier tipo de fibra ni celulosa).

Se utiliza la celulosa como fibra-control para la comparación con los resultados de las muestras de fibra alimentaria proveniente de judía Tolosa y lenteja de Armuña. Debido a que la celulosa se comporta como fibra alimentaria y mantiene su estabilidad estructural, ya que es difícil su ataque por las enzimas digestivas, además de bajo poder de hidratación e insolubilidad a reactivos, se utiliza como fibra control (Ou y col., 2001; Chau y col., 2003; Chau y col., 2004a y b; Chau y Huang, 2004; Benítez, 2011). Según Coutate (1986) es la estabilidad de la estructura ordenada de la celulosa que le confiere insolubilidad en casi todos los reactivos.

PROPIEDADES HIPOGLUCÉMICAS

Determinación de la Capacidad de Adsorción de Glucosa (CAG)

El objetivo de esta determinación es medir la capacidad que tienen los alimentos ricos en fibra (RLA) para adsorber glucosa, ya que esta capacidad disminuiría la concentración disponible de glucosa en el intestino delgado, evitando que ésta traspase la pared intestinal y llegue a la sangre, lo que produciría un descenso en la concentración de glucosa sérica postprandial.

Esta propiedad se determinó utilizando el método descrito por Ou y col. (2001), en el que 0,5 g de muestra se incuban con 50 ml de diferentes disoluciones de glucosa (10, 50, 100, 200 y 300 mM) en un baño a 37 °C con agitación durante 6 horas, período en que la mezcla llega a un equilibrio. Después de la incubación, las muestras se centrifugan durante 20 min a 4500 rpm, recuperándose el sobrenadante donde se mide la concentración de glucosa usando el Kit enzimático K-GLUC (Megazyme, Co., Wicklow, República de Irlanda), de acuerdo con el esquema de la Figura 6.1.

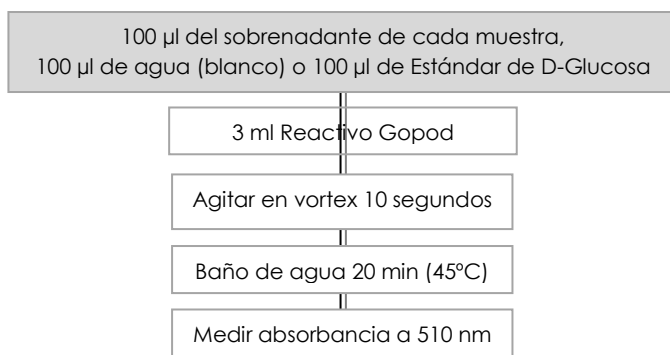


Figura 6.1 – Esquema del método de cuantificación de glucosa utilizando el kit enzimático K-GLUC (Megazyme).

Para hallar la concentración de la muestra se utiliza la absorbancia de ésta y del patrón, como:

$$\text{Concentración de glucosa de la muestra } (\mu\text{g}/0,1 \text{ ml}) = (\text{Absorb. muestra}/\text{Abs. patrón D-glucosa}) \times 100$$

Esta concentración medida corresponde a la glucosa no adsorbida por el RLA (concentrado de fibra) que está libre en la disolución del medio.

Para encontrar el valor de la glucosa adsorbida, es decir, la capacidad de adsorción de glucosa (CAG) de la fibra es necesario el siguiente calculo:

$$\text{CAG (mmol/g RLA)} = [(\text{Conc. Glucosa en la solución original} - \text{Conc. Glucosa en el equilibrio}) \times \text{Volumen de la disolución}] / \text{peso de la muestra (g)}$$

Donde la concentración de glucosa en la solución original es la concentración de glucosa utilizada inicialmente (10, 50, 100, 200 o 300 mM), y la concentración de glucosa en el equilibrio es la que se encuentra libre en el medio, transcurridas 6 horas de ensayo.

Índice de Adsorción de Glucosa (IAG)

Otro parámetro que se calcula es el índice de adsorción de glucosa (IAG), según la siguiente fórmula:

$$\text{IAG} = 100 - [(\text{concentración de glucosa medida} / \text{concentración de glucosa inicial}) \times 100]$$

Cuanto más altos son los valores observados en CAG e IAG mayor es la capacidad de la fibra para adsorber glucosa del medio.

Determinación de la Difusión de Glucosa (DG)

Es una medida que posibilita determinar cómo la presencia de materiales ricos en fibra retardan la absorción de la glucosa por el intestino, ya que cuanto mayor es el retardo menor será la cantidad de glucosa difundida durante la digestión y, por tanto, mayor sería el descenso de glucosa postprandial en sangre. Este método utiliza membranas de diálisis como similitud a las membranas celulares del organismo humano.

El método utilizado es el descrito por Ou y col. (2001). A 0,5 g de muestra se le añaden 12,5 ml de solución de glucosa 100 mM (1250 μmol de glucosa) que son transferidos a una membrana de diálisis de 12.000-14.000 kD (masa molecular de corte), este sistema se dializa frente a 100 ml de agua destilada en tubos de autoclave de 500 ml (Figura 6.2). Se toman muestras del dializado a los 10, 20, 30, 60, 90, 120 y 180 min y se mide el contenido en glucosa (Kit enzimático K-GLUC, Megazyme). Paralelamente, se hace un control, sin muestra, para ver la cantidad de glucosa que se dializa en ausencia de fibra, así como,

otro es el que se utiliza la celulosa en lugar del RLA. Para los tiempos 60 y 120 minutos es necesario hacer una dilución de por lo menos 1:2.

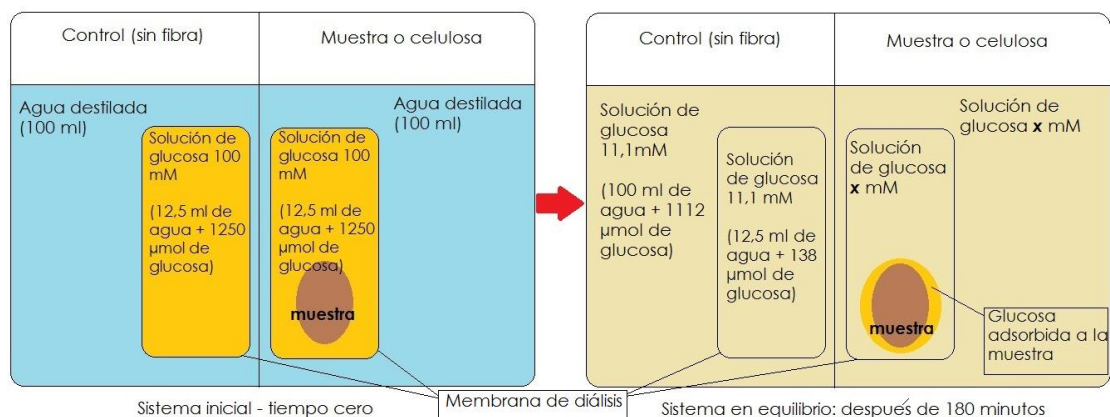


Figura 6.2 – Sistema de Difusión de Glucosa en el control y en la muestra o celulosa.

Índice de Retardo de Diálisis de Glucosa (IRDG)

Por otro lado, el índice de retardo de diálisis de glucosa (IRDG) expresado en %, se calcula como:

$$\text{IRDG (\%)} = 100 - [\text{contenido de glucosa en el dializado (sistema con muestra)} / \text{contenido de glucosa en el dializado (sistema control)} \times 100]$$

Glucosa total adsorbida por la fibra en el sistema: glucosa → fibra → membrana

Según Ou y col. (2001), cuando se alcanza el equilibrio en diálisis (180 minutos en el presente trabajo), la diferencia entre: (a) la cantidad de glucosa en diálisis del control (glucosa 100 mM) menos (b) la cantidad de glucosa en diálisis de la muestra (glucosa + fibra), puede ser considerada como (c) la cantidad total de glucosa adsorbida por la fibra.

$$a - b = \text{glucosa total adsorbida por la fibra (c)}$$

Velocidad máxima de difusión de glucosa (μmol/min)

Una vez obtenidos los resultados de difusión de glucosa, los valores son transferidos a una gráfica donde se obtiene una ecuación polinomial para cada muestra, control y celulosa:

$$Y = ax^2 + bx + c, \text{ donde } Y \text{ es el contenido de glucosa en } \mu\text{mol}; x \text{ es el tiempo en minutos; } a, b, c \text{ son los coeficientes.}$$

La primera derivada de esta ecuación corresponde a la velocidad de difusión de la glucosa, es decir, la velocidad a que la glucosa traspasa la membrana:

$Y' = 2ax + b$, donde Y' es la velocidad de difusión de glucosa en $\mu\text{mol}/\text{min}$; x es el tiempo en minutos; a , b son los coeficientes.

Según indican Ou y col. (2001) cuando el tiempo se aproxima a cero ($x = 0$) la difusión es máxima ($Y' = V_{\text{max}} = b$), según la regla de gradiente de concentración, donde un soluto encuentra su equilibrio difundándose de un medio más concentrado a otro menos concentrado (Figura 6.3). Esto se observaría en el momento cero ya que esta situación sería de alta concentración de glucosa dentro de la bolsa de diálisis y ausencia del monosacárido en el dializado.

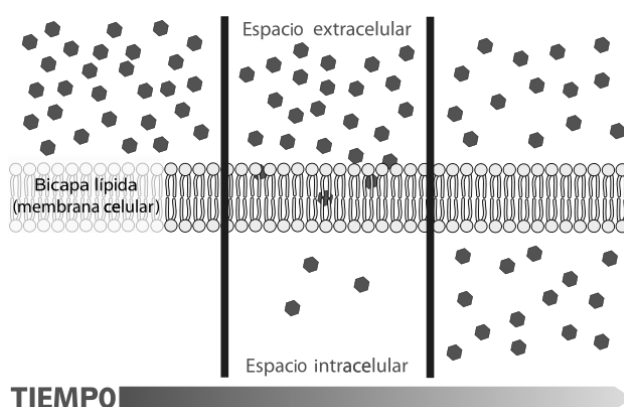


Figura 6.3 – Esquema de difusión simples en membrana.

La glucosa se difundiría por la membrana hasta alcanzar equilibrio entre los dos medios: dentro de la membrana y en el dializado, que según Ou y col. (2001) después de medir la DG durante 12 horas descubrieron que el equilibrio se alcanza próximo a las 5 horas de incubación. En el presente trabajo el ensayo tuvo una duración de 180 minutos.

Flujo de difusión de glucosa ($\mu\text{mol}/\text{min}$)

El flujo de glucosa es otro parámetro que se puede obtener a partir de los resultados de difusión de glucosa. Cuando se divide la glucosa observada en el dializado por el tiempo en minutos en que es hecha dicha medida de obtiene el flujo de difusión de glucosa en $\mu\text{mol}/\text{min}$.

Determinación de la Capacidad de Inhibir la Actividad α -Amilasa (CIA α)

Con esta propiedad se pretende conocer en qué magnitud interfiere el material rico en fibra (celulosa y muestras de RLA) sobre la actividad de la enzima α -amilasa. La

reducción en la actividad α -amilasa supone un retardo en la tasa de producción de glucosa, ya que se impediría la hidrólisis de polisacáridos como el almidón.

Siguiendo el método de Chau y col. (2003), 0,5 g de muestra se mezclan con 2 mg de α -amilasa y con 20 ml de una solución de almidón al 4% (p/v), se incuban a 37 °C durante 60 min, tras los cuales se añaden 40 ml de NaOH 0,1 M para detener la hidrólisis; posteriormente se centrifuga a 3000 rpm durante 15 min. La glucosa se mide en el sobrenadante (kit enzimático K-GLUC, Megazyme). Se realiza un control sin muestra para ver la cantidad de glucosa que se produce en ausencia de fibra, que sirve además para calcular el porcentaje residual de actividad enzimática.

Para preparar la solución de almidón 4% (p/v) es muy importante que la mezcla permanezca soluble y no precipite el almidón.

Determinación de la digestibilidad del almidón (IDiAl)

Esta propiedad mide a la vez el efecto que tiene la fibra sobre la hidrólisis del almidón y la posterior adsorción de los productos de la hidrólisis, en función del tiempo.

Para su determinación (Ou y col., 2001) se pesan 0,25 g de muestra, 0,05 g de α -amilasa y se añaden 12,5 ml de una disolución de almidón al 4% (p/v). La mezcla se dializa contra 100 ml de agua destilada usando una membrana de diálisis de 12.000-14.000 kD de masa molecular de corte. Se toman muestras del dializado a los 10, 20, 30, 60, 90, 120 y 180 min y se mide el contenido en glucosa (kit enzimático K-GLUC, Megazyme). Se realiza un control sin muestra para ver la cantidad de glucosa que se dializa en ausencia de fibra.

Asimismo, el Índice Digestibilidad del Almidón (IDiAl) expresado en %, se calcula de la siguiente forma:

$$\text{IDiAl (\%)} = 100 - [\text{contenido de glucosa en el dializado (sistema con muestra)} / \text{contenido de glucosa en el dializado (sistema control)} \times 100]$$

Velocidad máxima de digestibilidad del almidón (mmol/min)

Aplicando los mismos cálculos del apartado "Velocidad máxima de difusión de glucosa" se determina la velocidad máxima de digestibilidad del almidón en mmol/min.

6.4 RESULTADOS Y DISCUSIONES

Todas las propiedades hipoglucémicas estudiadas son referentes al material libre de almidón (RLA) que es un tipo de concentrado de fibra sin la presencia de almidón y de azúcares libres.

CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE GLUCOSA (CAG)

Como ya se ha explicado inicialmente, la importancia de estudiar la CAG de los alimentos se debe al interés de conocer la capacidad que tiene la fibra de retener moléculas de glucosa y no permitir que éstas sean absorbidas por el organismo. Los resultados obtenidos para leguminosas son reflejados en la Tabla 6.1 y Figura 6.4A y revelan que todas las muestras de fibra de judía y lenteja son capaces de adsorber glucosa (0,09 a 6,64 mmol/g RLA), siendo mayor la CAG cuanto más glucosa exista en el medio, hasta alcanzar la saturación de la fibra. Además, la CAG de RLA de leguminosas crudas y procesadas es superior a la celulosa en casi todas las concentraciones de glucosa comprendidas entre 10 y 300 mM, la misma relación encontraron Ou y col. (2001) y Chau y col. (2003, 2004a, 2004b). Esto significa que para diferentes tipos de fibra alimentaria, el almidón resistente y la fibra insoluble pueden, también, adsorber la glucosa en disoluciones de diferentes concentraciones (Ou y col., 2001). Por lo tanto, la fibra de leguminosas adsorbe mayor contenido de glucosa que la celulosa, lo que se supone de gran interés, ya que su utilización reduciría la concentración de glucosa disponible en el intestino delgado (Ou y col., 2001; Benítez, 2011).

Entre las muestras crudas, la judía presenta mayor capacidad en adsorber glucosa en las concentraciones de 10 hasta 100 mM de glucosa (Tabla 6.1) que la lenteja, mientras que a concentraciones más altas (200 y 300 mM) la muestra cruda de lenteja presenta mayor CAG que la judía. A concentración de 100 mM, la capacidad de adsorber glucosa de la muestra cruda de lenteja (0,7 mmol/g RLA) presenta valor similar a otros productos como los concentrados de fibra insoluble de salvado (0,5 mmol/g) (Ou y col., 2001) y de RIA de calabaza (0,6 mmol/g) (Escalada-Pla y col., 2007), también incubadas a 100 mM de glucosa. Chau y col. (2004b) estudiando fibras de carambola observaron que para concentraciones 10 mM de glucosa, la CAG no superó 0,17 - 0,23 mmol/g, valores similares al presente trabajo. Sin embargo, a concentraciones superiores (50 mM) la capacidad de adsorción de glucosa encontrada (5,7 mmol/g) es notablemente superior (diez veces mayor) que los del presente trabajo. Otras publicaciones también muestran un alto valor de CAG cuando la incubación con glucosa es alta, principalmente con concentraciones 100 mM, en naranja (9,4 mmol/g RIA) (Chau y col., 2003), en muestras de fibra de zanahoria (10,9 mmol/g fibra) (Chau y col., 2004a) y de maracuyá (10,4 mmol/g fibra) (Chau y Huang 2004). Estas diferencias pueden ser debidos a las propiedades de hidratación de la fibra (Chau y col., 2003; Escalada-Pla y col., 2007) y su preferencia por las moléculas de agua a glucosa, lo que demostraría la afinidad de estas fibras de judías y lentejas hacia moléculas de agua, cuando la concentración de glucosa del medio es superior a 50 mM.

Tabla 6.1 – Capacidad de absorción de glucosa (mmol/g RLA) de leguminosas crudas y procesadas.

		Concentración de Glucosa mM				
Muestra		10	50	100	200	300
Celulosa*		0,08 ± 0,00 ^a	0,30 ± 0,01 ^b	0,39 ± 0,01 ^a	3,10 ± 0,04 ^b	3,78 ± 0,11 ^a
Judía	Cruda	0,13 ± 0,01 ^c	0,49 ± 0,02 ^c	1,21 ± 0,07 ^d	3,46 ± 0,07 ^c	4,64 ± 0,09 ^b
	Cocida	0,18 ± 0,02 ^d	0,57 ± 0,09 ^d	1,43 ± 0,01 ^e	4,86 ± 0,02 ^f	6,64 ± 0,17 ^f
	Germinada	0,13 ± 0,01 ^{bc}	0,31 ± 0,00 ^b	0,76 ± 0,06 ^c	3,71 ± 0,07 ^d	4,95 ± 0,04 ^{bc}
Lenteja	Cruda	0,09 ± 0,01 ^{ab}	0,24 ± 0,01 ^a	0,67 ± 0,01 ^{bc}	3,95 ± 0,07 ^e	5,23 ± 0,17 ^{cd}
	Cocida	0,17 ± 0,01 ^d	0,34 ± 0,02 ^b	0,47 ± 0,01 ^a	2,75 ± 0,04 ^a	5,83 ± 0,41 ^e
	Germinada	0,16 ± 0,02 ^{cd}	0,33 ± 0,04 ^b	0,60 ± 0,07 ^b	3,58 ± 0,04 ^c	5,45 ± 0,07 ^{de}

Los valores son medias ± DE (n=3). Medias dentro de una columna con diferentes letras son significativamente diferentes a p<0,05.

CAG = (Concentración de glucosa inicial – concent. de glucosa cuando la adsorción alcanza el equilibrio 6 h) x volumen de la disolución / peso del RLA.

RLA: Residuo Libre de Almidón; *Celulosa: valores expresados en mmol/g fibra

En general, el proceso de cocción incrementa la CAG en ambas leguminosas. En el caso de la judía se muestra claramente que la fibra de las muestras sometidas al tratamiento térmico son las que más glucosa han adsorbido de todas las muestras estudiadas, presentando incrementos de 40% con las concentraciones de glucosa de 10, 200 y 300 mM. Por otro lado, la lenteja cocida presenta incrementos del orden de 88% a 10 mM, de 41% a 50 mM y de 11% a 300 mM, mientras que presenta reducciones puntuales de la CAG, cuando la muestra es incubada con 100 y 200 mM (30% de reducción) de glucosa. Benítez (2011) encontró una tendencia a la disminución de la capacidad de adsorción de glucosa en concentrados de fibra de cebolla y sus subproductos estabilizados térmicamente.

La germinación reduce la CAG en la muestra de judía, principalmente a concentraciones de glucosa de 50 y 100 mM (37%), mientras que a concentraciones superiores a 100 mM se aprecian ligeros incrementos (7%). En el caso de las lentejas no hay diferencias entre la cocción y germinación presentando el mismo comportamiento, mientras que a concentraciones de 100 y

200 mM, la lenteja germinada parece mostrar mayor CAG que la muestra cocida. Chau y col. (2007) trabajando con zanahoria micronizada observaron notables incrementos en la CAG, y esto podría ser debido a un aumento del área superficial y de la porosidad provocada por el proceso de micronización. Por lo tanto, esta consideración podría indicar que la cocción y germinación provocarían un incremento del área superficial y de la porosidad de leguminosas como judía de Tolosa y lenteja de La Armuña.

No obstante, se destaca que los RLA de judía y lenteja tanto crudas como procesadas pueden adsorber glucosa incluso a bajas concentraciones (10 mM). Esta característica también se ha encontrado en residuos ricos en fibra procedentes de hortalizas y frutas (López y col., 1996; Ou y col., 2001; Chau y col., 2003; Benítez, 2011). De esta forma, se podría especular que la fibra de leguminosas ayuda a retener la glucosa en el lumen intestinal, incluso a concentraciones bajas, pero cuando la concentración de glucosa disminuye a 0,5 mM no se observa CAG, según Ou y col. (2001).

De acuerdo con los resultados, esta propiedad es dependiente de la concentración de glucosa, de manera que cuanto mayor es la concentración de glucosa del medio mayor es la cantidad de glucosa que se une a la matriz de la fibra alimentaria, hasta que ésta se sature (Benítez, 2011). Para investigar la tendencia del comportamiento de la CAG de la fibra alimentaria frente a concentraciones crecientes de glucosa (50 y 300 mM) y extrapolar hasta donde se alcanzaría la saturación de la fibra alimentaria se analiza estadísticamente los resultados por medio de regresión. El resultado de esta relación se describe mejor utilizando las ecuaciones cuadráticas (polinomial), por los mejores valores de R^2 y por la facilidad en explicar sus interacciones (Tabla 6.2). Estas ecuaciones pueden responder, por ejemplo, a la máxima capacidad de adsorción de glucosa que tendría cada una de las muestras y en qué concentración ocurriría esto.

Tabla 6.2 – Regresión cuadrática de CAG (mmol/g RLA) frente a concentración de glucosa (mM).

Muestra	Ecuación	R^2	CAG max. (Y)	Concentración mM (x)
Celulosa	$Y = -0,00002x^2 + 0,0241x - 1,1713$	0,93	6,1*	603
Judía cruda	$Y = -0,00002x^2 + 0,0254x - 0,8563$	0,99	7,2	635
Judía cocida	$Y = -0,00003x^2 + 0,0348x - 1,3386$	0,99	8,8	580
Judía germinada	$Y = -0,00002x^2 + 0,0276x - 1,2850$	0,97	8,2	690
Lenteja cruda	$Y = -0,00003x^2 + 0,0306x - 1,5480$	0,97	6,3	510
Lenteja cocida	$Y = 0,00007x^2 - 0,0009x + 0,1093$	1,00	0,1**	6
Lenteja germinada	$Y = -0,00006x^2 + 0,0465x - 3,5052$	1,00	5,5	388

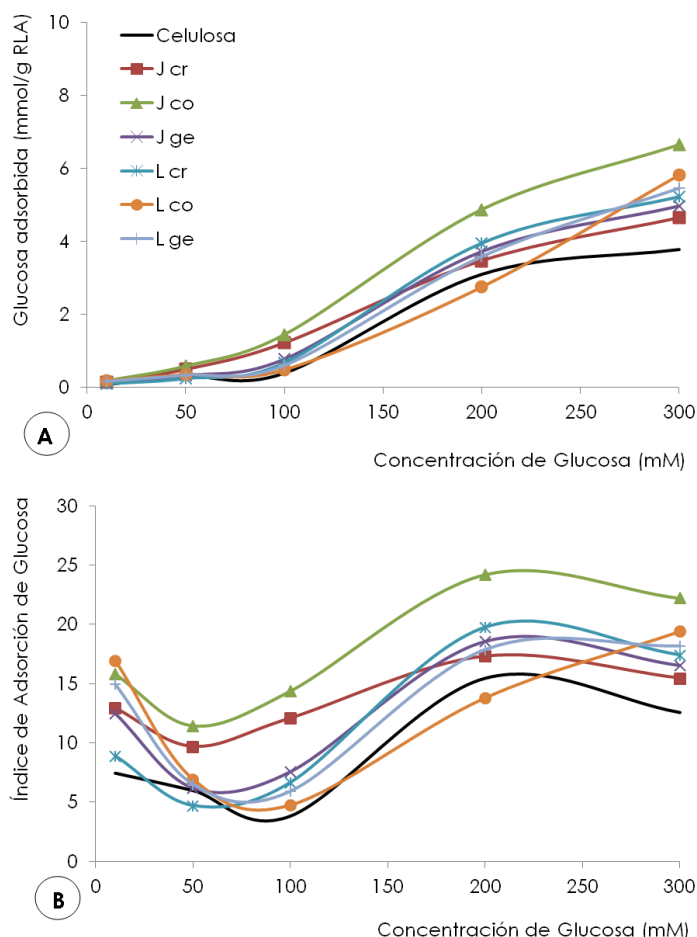
Y: CAG máxima estimada (mmol/g RLA); *Celulosa: valor expresado en mmol/g fibra; **punto mínimo, no es posible calcular el valor máximo de CAG para esta muestra; x: concentración de glucosa (mM) en la cual se calcula el valor más alto de CAG (Y); RLA: Residuo Libre de Almidón

En general, según las ecuaciones de la Tabla 6.2, la CAG de las leguminosas, e incluso de la celulosa, no superarían valores entre 6,1 - 8,8 mmol/g, sabiendo que esta capacidad máxima de adsorción de glucosa se alcanzaría entre 510 y 690 mM de glucosa. Sin embargo, en el caso de lenteja germinada la concentración de 388 mM de glucosa sería suficiente para saturar la fibra y capacitarla para adsorber 5,5 mmol de glucosa/g RLA. Estos resultados indican que a partir de concentraciones de 700 mM la fibra de las

leguminosas estudiadas ya se encontraría saturada y no adsorbería más glucosa. La única muestra que presenta tendencia en no saturar la fibra es la lenteja cocida, en este caso sería necesario otros ensayos con concentraciones de glucosa superiores a 300 mM para encontrar en qué condiciones ocurriría la saturación de la fibra de lenteja cocida.

Índice de Adsorción de Glucosa (IAG)

Otra forma de analizar la capacidad de adsorción de glucosa es su Índice de Adsorción de Glucosa (IAG), expresado en % de glucosa adsorbida referente al total. Según la Figura 6.4B se observa que todas las muestras, incluso la celulosa, presentan su mayor IAG a concentraciones de 200 mM, excepto lenteja cocida que lo muestra a 300 mM con valor próximo a 20. Esto indica que aumentando la concentración de glucosa a niveles superiores a 200 mM el índice de adsorción de glucosa tenderá a ser constante hasta que el RLA se sature. De esta forma, para un intervalo de 10 hasta 300 mM de glucosa, las fibras (RLA de judía de Tolosa y lenteja de Armuña) tendrán una capacidad de adsorber entre 5 y 20% de la glucosa total del medio (Figura 6.4B). Chau y col. (2004a) afirman que la capacidad de la fibra de adsorber glucosa es mayor a bajas concentraciones de glucosa como las disponibles en el intestino delgado. Esta hipótesis también se observa en parte en el presente trabajo, donde el IAG es mayor a 10 mM que a 50 y 100 mM, pero no a 200 mM y 300 mM, para todas las muestras estudiadas.



Jcr: judía cruda; Jco: judía cocida; Jge: judía germinada; Lcr: lenteja cruda; Lco: lenteja cocida; Lge: lenteja germinada; IAG: Índice de adsorción de glucosa (%) = $100 - [(conc. glucosa medida / conc. glucosa inicial) \times 100]$; RLA: Residuo Libre de Almidón; Celulosa: valores de Glucosa adsorbida expresados en mmol/g fibra

Figura 6.4 – (A) Capacidad de absorción de glucosa (mmol glucosa/g RLA). (B) Índice de adsorción de glucosa (%).

La elevada afinidad de ciertas matrices de fibra a las moléculas de agua es, probablemente, un obstáculo para la mayor retención de glucosa (Escalada-Pla y col., 2007). La molécula de β -D-glucosa adopta una conformación termodinámicamente favorecida (4C_1 = conformación en silla), cuando se encuentra solvatada con agua. La conformación en silla es la más estable, porque todos los carbonos contiguos (tomados dos a dos) están en conformación alternada (Figura 6.5), lo que disminuye las interacciones entre los sustituyentes. En la molécula de glucosa la conformación en forma silla presenta todos los grupos OH en posición ecuatorial. De esta manera se maximiza la posible interacción con disolventes acuosos a través de puentes de hidrógeno. Asimismo, esta conformación de la glucosa favorece la permanencia de las

moléculas de agua más cercana a cada molécula de glucosa. Por lo tanto, la retención de moléculas de β -D-glucosa por polisacáridos provenientes de fibra puede suponer un favorecimiento termodinámico uniendo o atrapando la moléculas hidratadas de D-glucosa por los grupos hidrófilos de la red de polisacáridos (Escaldada Pla y col., 2007).

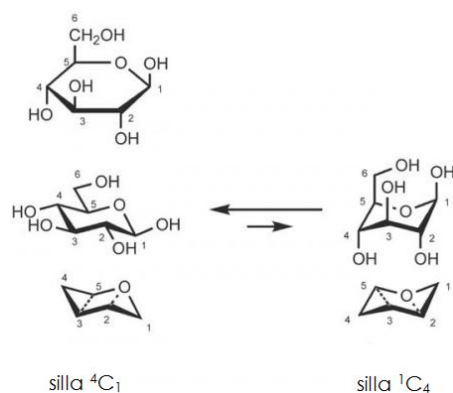
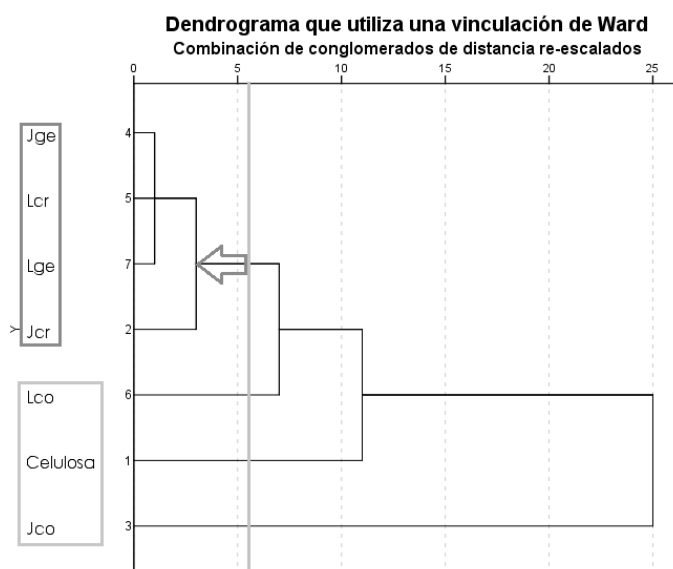


Figura 6.5 – β -D-Glucosa en proyección Haworth y en sus conformaciones silla: 4C_1 y 1C_4 .

Otra forma de analizar los resultados es la aplicación de conglomerados (explicado anteriormente en el Capítulo 1) (Figura 6.6), donde se busca conocer la mayor o menor similitud entre las muestras. Este análisis tiene como objetivo ordenar objetos en grupos, es decir, agrupar los tratamientos según los resultados de la CAG. Según el dendrograma obtenido se observa claramente que los tratamientos afectan la capacidad de adsorción de glucosa en ambas leguminosas. Las muestras crudas y germinadas de judía y lenteja son más próximas, formando un grupo distinto de judía y lenteja cocidas. Esto expresa que el tratamiento térmico afecta las propiedades de la fibra, diferenciando las muestras cocidas de las muestras crudas y germinadas. Por lo tanto, el grado de destrucción química o estructural por el calor ejerce un efecto directo sobre el valor de la capacidad de adsorción de glucosa tal como lo muestra Nishimune y col. (1991).



Jcr: judía cruda; Jco: judía cocida; Jge: judía germinada; Lcr: lenteja cruda; Lco: lenteja cocida; Lge: lenteja germinada

Figura 6.6 – Dendrograma de la Capacidad de Adsorción de Glucosa de leguminosas crudas y procesadas.

DIFUSIÓN DE GLUCOSA (DG)

La propiedad de difusión de glucosa por una membrana semipermeable indica si la presencia de alimentos ricos en fibra retarda la absorción de la glucosa en el intestino. La DG se mide en función del tiempo, y consiste en analizar la concentración de glucosa que traspasa la membrana de diálisis a los 10, 20, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos.

La Tabla 6.3 presenta las variaciones en la DG con la adición de los concentrados de fibra (RLA), contrastado con la celulosa y el control (sin muestra). Se observa que según aumenta el tiempo de diálisis, se incrementa también la cantidad de glucosa en el dializado; así a los 10 minutos el contenido de glucosa varía entre 60 μmol llegando a $\pm 450 \mu\text{mol}$ a los 180 minutos. Comparando con el control, éste presenta valores superiores al RLA de leguminosas independiente del tiempo, indicando que la fibra de leguminosas tiene capacidad de disminuir la difusión de la glucosa por la membrana.

Las muestras crudas de judía y lenteja presentan valores de DG próximos entre sí, para cualquier periodo de tiempo. Estos resultados son del mismo orden que los observados en la bibliografía (Chau y col., 2003) cuando se trata de fibra de piel de naranja, aunque son notablemente superiores a RIA de carambola (Chau y col., 2004b).

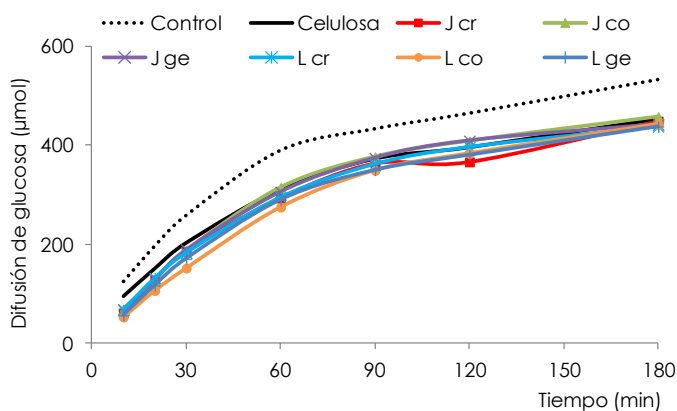
Tabla 6.3 – Difusión de la Glucosa (μmol) del RLA de leguminosas crudas y procesadas.

		Glucosa en el dializado (μmol)						
Muestra		10 min	20 min	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
Control		125,0 \pm 2,8 ^e	197,0 \pm 2,8 ^e	259,0 \pm 1,4 ^d	390,5 \pm 6,4 ^c	434,5 \pm 6,4 ^c	465,5 \pm 3,5 ^b	533,5 \pm 12,0 ^b
Celulosa		95,5 \pm 0,7 ^d	151,5 \pm 2,1 ^d	203,0 \pm 2,8 ^c	310,5 \pm 4,9 ^b	372,0 \pm 4,2 ^{ab}	395,0 \pm 11,3 ^a	452,0 \pm 15,6 ^a
Judía	Cruda	61,5 \pm 2,1 ^{bc}	128,0 \pm 7,1 ^{bc}	186,0 \pm 12,7 ^{bc}	293,5 \pm 6,4 ^{ab}	363,5 \pm 12,1 ^{ab}	366,5 \pm 36,1 ^a	445,0 \pm 7,0 ^a
	Cocida	69,0 \pm 4,2 ^c	128,0 \pm 1,4 ^{bc}	187,5 \pm 7,8 ^{bc}	315,0 \pm 9,9 ^b	377,0 \pm 4,2 ^b	409,0 \pm 14,1 ^a	458,0 \pm 9,9 ^a
	Germinada	68,5 \pm 2,1 ^c	130,0 \pm 1,4 ^{bc}	189,5 \pm 7,8 ^{bc}	306,0 \pm 9,9 ^b	374,0 \pm 11,3 ^{ab}	409,0 \pm 14,1 ^a	442,0 \pm 9,9 ^a
Lenteja	Cruda	67,5 \pm 2,1 ^c	132,0 \pm 7,1 ^c	183,0 \pm 5,7 ^{bc}	295,0 \pm 9,9 ^{ab}	362,0 \pm 11,3 ^{ab}	396,5 \pm 13,4 ^a	438,5 \pm 19,1 ^a
	Cocida	53,0 \pm 5,7 ^a	106,5 \pm 10,6 ^a	152,0 \pm 14,2 ^a	275,0 \pm 18,4 ^a	349,5 \pm 16,3 ^a	383,5 \pm 19,1 ^a	442,5 \pm 14,8 ^a
	Germinada	56,5 \pm 2,1 ^{ab}	117,0 \pm 5,7 ^{ab}	171,0 \pm 5,7 ^{ab}	290,0 \pm 9,9 ^{ab}	350,0 \pm 11,3 ^a	380,5 \pm 13,4 ^a	438,5 \pm 19,1 ^a

Los valores son medias \pm DE, n=3. Las medias dentro de una columna con diferente superíndice son significativamente diferentes para $P < 0,05$; RLA: Residuo Libre de Almidón

El procesamiento afecta de diferentes formas la difusión de la glucosa en las leguminosas estudiadas. El proceso de cocción en judía causa un aumento de la difusión de la glucosa, principalmente a los 10 minutos (12%). Sin embargo, el tratamiento térmico en lenteja, en general, disminuye la cantidad de glucosa difundida, siendo más acentuada a los 10 minutos de diálisis (21%). La germinación sigue la misma tendencia que la cocción para ambas leguminosas, donde se aprecia un incremento en el contenido de glucosa difundida en las muestras de judía germinada (aumento más significativo 11%, a los 10 y 120 minutos) y una reducción en lenteja germinada (decrecimiento de 16% a los 10 minutos) respecto a las muestras crudas.

En comparación con el control, se observa que todas las muestras estudiadas, incluida la celulosa, provocan un retraso en la difusión del contenido de glucosa hacia el exterior a través de la membrana de diálisis (Figura 6.7). Las fibras disminuyeron significativamente la cantidad de glucosa del dializado con respecto a la muestra control (sin fibra), principalmente en los primeros 10 minutos (48% de reducción). Además, entre los 20 y 30 minutos, el RLA de leguminosas reduce la DG en 30%, y con 1 hora de incubación disminuye 25%, hasta que, a partir de las 2 horas de ensayo la difusión de glucosa es reducida en 15%, respecto al control. En el inicio de la diálisis, la difusión de la glucosa se vio afectada por la adsorción y la viscosidad de la fibra, por lo que la tasa de difusión de la glucosa en muestras de fibra es lenta, comparada al control (sin muestra), aunque la concentración en la bolsa de diálisis es alta (Ou y col., 2001). Estos resultados surgieron que la fibra de leguminosas presenta la capacidad de disminuir la difusión de glucosa y que probablemente tienen la capacidad de reducir la absorción de glucosa en el tracto digestivo.

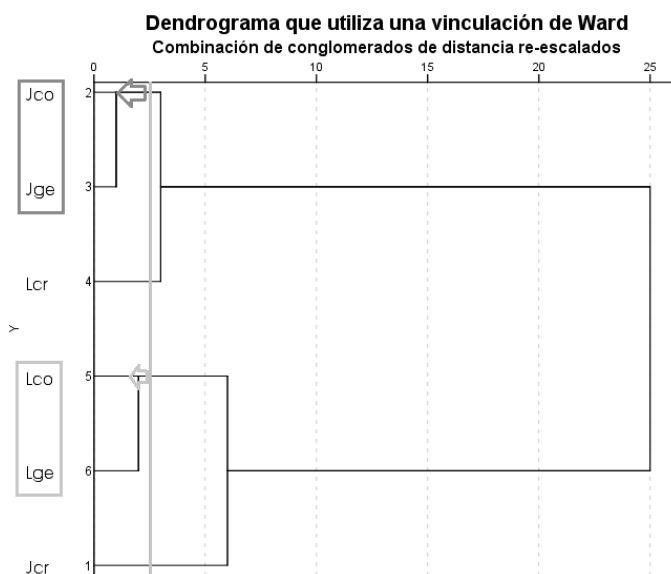


Jcr: judía cruda; Jco: judía cocida; Jge: judía germinada; Lcr: lenteja cruda; Lco: lenteja cocida; Lge: lenteja germinada; control (sin adición de fibra)

Figura 6.7 – Glucosa en el dializado o Difusión de Glucosa (μmol) de leguminosas crudas y procesadas.

Con estos resultados se puede especular que cuando se añaden $1250 \mu\text{mol}$ de glucosa (cantidad inicial de glucosa del sistema = $12,5 \text{ ml}$ de glucosa 100 mM), pasadas las 3 horas de diálisis y en ausencia de fibra, hipotéticamente, se observaría que solamente $717 \mu\text{mol}$ no serían absorbidos por el intestino (glucosa difundida por el control $534 \mu\text{mol}$, 180 minutos), mientras que en presencia de fibra alimentaria (RLA) se observaría que aproximadamente $810 \mu\text{mol}$ aún no serían absorbidos por el organismo. Esto representa $93 \mu\text{mol}$ de glucosa que estaría retenida por la fibra de leguminosas en el lumen intestinal.

Otra forma de interpretar los resultados de difusión de glucosa de muestras de RLA de leguminosas es el empleo de combinaciones de conglomerados (Figura 6.8). Para analizar la influencia de los tratamientos en la difusión de la glucosa (mM) con el paso del tiempo ($10 - 180 \text{ min}$) se relacionan todos los resultados de DG y se expresan como dendrograma. De acuerdo con la Figura 6.8 se confirma que las muestras procesadas difieren poco entre sí formando dos grupos más similares: a) judía cocida y judía germinada; b) lenteja cocida y lenteja germinada. Por tanto, se puede decir que el procesamiento afecta la difusión de la glucosa en muestras de judía de Tolosa y lenteja de La Armuña.



Jcr: judía cruda; Jco: judía cocida; Jge: judía germinada; Lcr: lenteja cruda; Lco: lenteja cocida; Lge: lenteja germinada

Figura 6.8 – Dendrograma de la Difusión de Glucosa de leguminosas crudas y procesadas.

Para analizar cómo cada gramo de fibra afecta la difusión de la glucosa a través de la membrana de diálisis, se expresan los resultados por gramo de fibra (Tabla 6.4). Se observa que todas las fibras de leguminosas presentan una mayor capacidad de reducción de la difusión de glucosa, comparada con la celulosa. Es notable las reducciones provocadas por la fibra (RLA) de las leguminosas durante los primeros 10 minutos de diálisis (35%) con relación a la celulosa, sin embargo, a los 30 minutos la diferencia entre la cantidad de glucosa difundida por la fibra de leguminosas y la celulosa es de solamente 8%. Al paso de 3 horas de incubación prácticamente no se observan diferencias entre la difusión de glucosa del RLA y de la celulosa. De esta forma, se puede decir que la fibra de las leguminosas afectan más eficientemente la difusión de la glucosa hasta los 30 minutos de diálisis, siendo más notable en los primeros 10 minutos, respecto a la celulosa.

Tabla 6.4 – Difusión de la Glucosa ($\mu\text{mol/g RLA}$) de leguminosas crudas y procesadas.

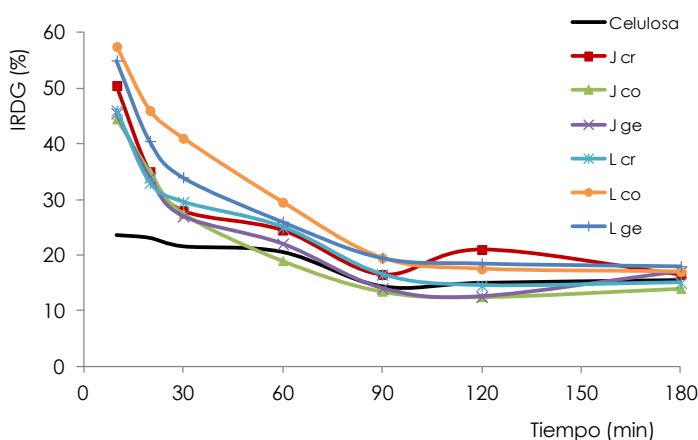
		Glucosa en el dializado ($\mu\text{mol/g RLA}$)						
Muestra		10 min	20 min	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
Celulosa*		763 ± 5^d	1.210 ± 18^c	1.625 ± 23^c	2.481 ± 35^b	$2.972 \pm 36,1^a$	3.159 ± 91^a	3.613 ± 125^a
Judía	Cruda	494 ± 14^{bc}	1.024 ± 58^b	1.484 ± 100^{bc}	2.349 ± 54^{ab}	$2.908 \pm 95,5^a$	2.934 ± 285^a	3.600 ± 113^a
	Cocida	552 ± 37^c	1.021 ± 11^b	1.498 ± 62^{bc}	2.518 ± 83^b	$3.013 \pm 35,4^a$	3.272 ± 113^a	3.660 ± 79^a
	Germinada	547 ± 21^c	1.040 ± 11^b	1.514 ± 63^{bc}	2.444 ± 81^b	$2.992 \pm 87,7^a$	3.266 ± 113^a	3.534 ± 76^a
Lenteja	Cruda	540 ± 17^c	1.057 ± 54^b	1.462 ± 48^{bc}	2.354 ± 79^{ab}	$2.895 \pm 93,3^a$	3.170 ± 110^a	3.506 ± 153^a
	Cocida	422 ± 41^a	849 ± 81^a	1.216 ± 111^a	2.198 ± 149^a	$2.794 \pm 130,1^a$	3.064 ± 150^a	3.537 ± 120^a
	Germinada	451 ± 14^{ab}	938 ± 49^{ab}	1.367 ± 45^{ab}	2.320 ± 78^{ab}	$2.806 \pm 90,5^a$	3.049 ± 106^a	3.509 ± 153^a

Los valores son medias \pm DE, n=3. Las medias dentro de una columna con diferente superíndice son significativamente diferentes para $P<0,05$; RLA: Residuo Libre de Almidón; * $\mu\text{mol/g fibra}$;

Índice de Retardo de Diálisis de Glucosa (IRDG)

El retardo en la difusión de la glucosa de los distintos concentrados de fibra se expresa mediante el índice de retardo en la diálisis de glucosa (IRDG). El IRDG es un parámetro adecuado para predecir el efecto de la fibra en el retraso de la absorción de glucosa en el tracto gastrointestinal (López y col., 1996; Ou y col., 2001). La Figura 6.9 pone de manifiesto que todas las muestras incluyendo la celulosa pueden disminuir el flujo de glucosa en 3 horas de incubación, partiendo de un IRDG de 55% a los 10 minutos y llegando a 15% a 3 horas del experimento.

En la primera hora de incubación, el RLA de las muestras de leguminosas presentan IRDG (50%) muy superior a la celulosa (24%), pero a medida que transcurre el tiempo, cuando éste alcanza los 90 minutos no se observa diferencia significativa entre el IRDG de las leguminosas y celulosa, variando entre 15 y 20% para cualquier muestra. El IRDG disminuye con el tiempo, similar comportamiento lo encontraron Chau y col. (2003 y 2004a). Sin embargo, con la fibra de cebolla ocurre lo contrario, según Benítez (2011) a medida que pasa el tiempo se va produciendo un aumento del IRDG.



Jcr: judía cruda; Jco: judía cocida; Jge: judía germinada; Lcr: lenteja cruda; Lco: lenteja cocida; Lge: lenteja germinada; IRDG (%) = $100 - [\text{contenido de glucosa en el dializado (sistema con muestra)} / \text{contenido de glucosa en el dializado (sistema control)} \times 100]$

Figura 6.9 – Índice de Retardo de Diálisis de Glucosa (%) de RLA de leguminosas crudas y procesadas.

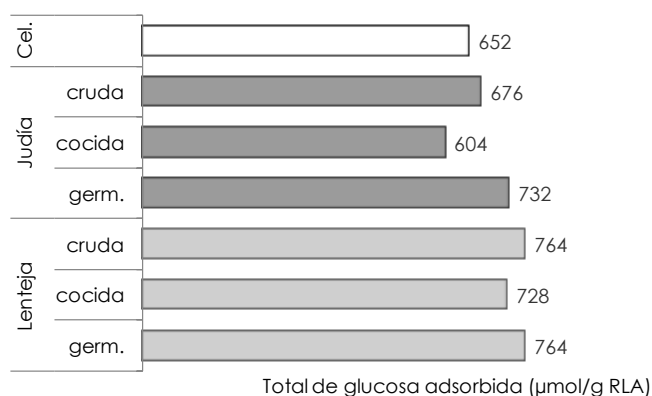
En el caso de lenteja el procesado incrementa el IRDG, principalmente en la cocción a los 20 y 30 minutos de diálisis (40% de aumento). Sin embargo, en el caso de judía se observan reducciones del IRDG tanto en muestras cocidas como germinadas, donde la reducción es más acentuada a los 120 minutos (40% de reducción) en ambos

procesamientos. Por tanto, en la lenteja, se puede afirmar que los procesamientos de cocción y germinación confieren a la fibra características que retardan más la difusión de la glucosa que la fibra de las muestras procesadas de judía. Con base en los resultados del presente trabajo, se podría decir que el RLA de lentejas y judías dificulta con éxito la difusión de la glucosa a través de la membrana, y son más eficientes que la celulosa, principalmente en los primeros 60 minutos de incubación.

Glucosa total adsorbida por la fibra en el sistema: glucosa → fibra → membrana

Además, otro factor que influye sobre la propiedad para reducir la cantidad de glucosa en diálisis, es la capacidad que tiene la fibra para adsorber este monosacárido. Según Ou y col. (2001), cuando se alcanza el equilibrio en diálisis (cerca de 180 minutos), la diferencia entre la cantidad de glucosa en diálisis del control (glucosa 100 mM) menos la cantidad de glucosa en diálisis de la muestra (glucosa + fibra), puede ser considerada como la cantidad total de glucosa adsorbida por la fibra, si se divide este resultado por el contenido de fibra o RLA del sistema.

De esta forma, se observa en la Figura 6.10 que el RLA adsorbe entre 604 y 764 μmol de glucosa/g RLA en un período de incubación de 180 minutos, cuando está presente una concentración inicial de 100 mM de glucosa. En general, las muestras que contienen RLA adsorben más glucosa que la celulosa (652 $\mu\text{mol/g}$), excepto la muestra de judía cocida (604 $\mu\text{mol/g}$ RLA). Asimismo, las muestras crudas de judía y lenteja adsorben más glucosa (9%) que las muestras cocidas, mientras que las muestras germinadas adsorben más glucosa (2%) que las muestras crudas.



RLA: Residuo Libre de Almidón; Cel.: celulosa, expresada en $\mu\text{mol/g}$ fibra

Figura 6.10 – Total de glucosa adsorbida por el RLA de leguminosas crudas y procesadas a los 180 minutos de incubación, según el método de Difusión de Glucosa.

Los resultados de Jenkins y col. (1981) demuestran que el retraso en la absorción de la glucosa en el tracto gastrointestinal está determinado por la viscosidad aportada por la fibra. Ou y col. (2001) alegan que con la adsorción saturada, la difusión de la glucosa sólo se ve afectada por la viscosidad de la fibra alimentaria, y la tasa de difusión no se reduce significativamente, incluso cuando la concentración de glucosa en la bolsa de diálisis disminuye.

Velocidad máxima de difusión de glucosa

Como se ha indicado previamente, la velocidad máxima se calcula cuando el tiempo de difusión se aproxima a cero. En la Tabla 6.5 se aprecia la velocidad máxima de difusión de glucosa en las muestras, que en orden decreciente es la siguiente: *control > celulosa > judía cocida, judía germinada > judía cruda, lenteja cruda, lenteja cocida y lenteja germinada*, lo que indica que el RLA leguminosas son más eficientes que la celulosa en reducir la difusión de glucosa. Asimismo, se observa que el procesamiento de la judía aumenta la velocidad de difusión de la glucosa, mientras que en lenteja este parámetro no se ve afectado. La variabilidad en las propiedades de hidratación podrían contribuir a las diferencias registradas en la velocidad de difusión de glucosa (Chau y Huang, 2003), debido a una mayor afinidad entre la matriz de la fibra alimentaria por agua que por glucosa.

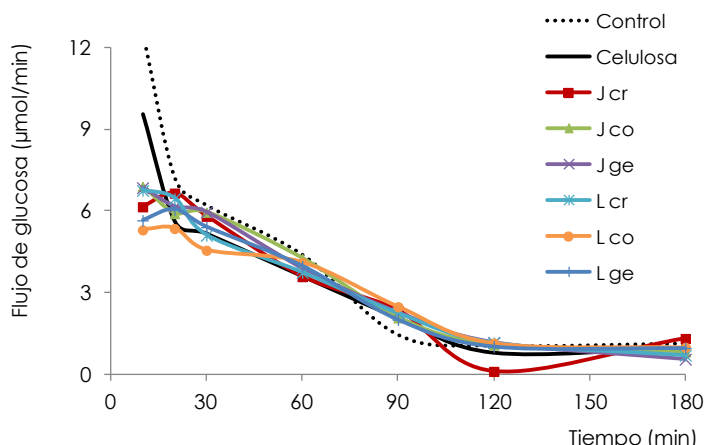
Tabla 6.5 – Velocidad máxima de difusión de glucosa (μmol/min) de leguminosas crudas y procesadas.

	Muestra							
	Control	Celulosa	J cr	J co	J ge	L cr	L co	L ge
V _{max} (μmol/min)	7,4	6,1	5,5	5,8	5,7	5,3	5,4	5,4

Jcr: judía cruda; Jco: judía cocida; Jge: judía germinada; Lcr: lenteja cruda; Lco: lenteja cocida; Lge: lenteja germinada

Flujo de Difusión de Glucosa (μmol/min)

El flujo de glucosa (μmol/min) se define como la cantidad de glucosa por unidad de tiempo de incubación (Figura 6.11). Durante los 10 primeros minutos, el control seguido de la celulosa son los que más difunden este monosacárido (85 y 43%, respectivamente), transcurridos los primeros 30 minutos es cuando se observa un mayor flujo de glucosa en la fibra (7 μmol/min), mientras que a partir de 120 minutos el flujo empieza a ser constante, próximo a cero.



Jcr: judía cruda; Jco: judía cocida; Jge: judía germinada; Lcr: lenteja cruda; Lco: lenteja cocida; Lge: lenteja germinada; control (sin adición de muestra)

Figura 6.11 – Flujo de glucosa ($\mu\text{mol}/\text{min}$) por bolsa de diálisis del RLA de leguminosas crudas y procesadas.

Los resultados de flujo de glucosa se diferencian ligeramente de la velocidad máxima (Tabla 6.5), porque esta última medida es una estimación de velocidad al tiempo cero, justo al empezar la diálisis. Por otro lado, el flujo de glucosa se calcula a partir de las observaciones de DG (en μmol) a cada intervalo de tiempo (10, 20, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos). Sin embargo, en ambos casos ($V_{\text{máx}}$ y flujo de glucosa) se puede decir, que la fibra de leguminosas en los primeros minutos de diálisis reduce la difusión de la glucosa por la membrana más eficientemente que la celulosa. En base a estos resultados se puede indicar que la fibra insoluble y el almidón resistente, componentes mayoritarios del RLA, presentan características que confieren al RLA propiedad de reducir la difusión de glucosa.

Además de la adsorción de glucosa, el retraso en la difusión de este monosacárido también puede ser atribuido a obstáculos físicos presentados por la fibra insoluble a las moléculas de glucosa y la captura de la glucosa dentro de la red formada por fibras (Nishimune y col., 1991). López y col. (1996) han demostrado que las fibras insolubles pueden tener mayor IRDG que las fibras solubles. A partir de estos resultados, se podría afirmar que la fibra de judías y lentejas podrían adsorber glucosa y retrasar su difusión, más eficientemente que la celulosa en los primeros 30 minutos de incubación (Figura 6.9), y por tanto, posponer la absorción de glucosa en el tracto gastrointestinal.

CAPACIDAD DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD α -AMILASA (CIAa)

En esta etapa se pretende conocer como la fibra interfiere en la actividad α -amilasa. En la Tabla 6.6 se presentan los resultados de la actividad α -amilasa afectados por la presencia de fibra de leguminosas. Se observa que en ausencia de fibra la α -amilasa es capaz de producir 1066 μmol glucosa/h. En general, el RLA de leguminosas tiene mayor capacidad de inhibir la actividad α -amilasa (CIAa) que la celulosa. Respecto a las muestras crudas, se aprecia que la judía presenta mayor CIAa (39%) que la lenteja (30%), siendo similares a CIAa de pasta de cebolla sin tratamiento (35%) (Benítez, 2011). Además, los resultados de CIAa observados en la celulosa (4%) son próximos a los encontrados en la literatura (Benítez, 2011; Chau y Huang, 2004).

Los resultados de producción de glucosa (Tabla 6.6) en las muestras crudas, indican que en presencia de RLA de judía la α -amilasa es capaz de hidrolizar el almidón y producir 646 μmol glucosa/g RLA/h, mientras que en presencia de RLA de lenteja cruda, la enzima consigue liberar mayor cantidad de glucosa (734 μmol glucosa/g RLA/h), sabiendo que en ausencia de fibra, la α -amilasa produce 1066 μmol glucosa/g RLA/h. Los resultados son similares a Ou y col. (2001) que encontraron 1036 μmol glucosa/g/h en el control, 923 μmol glucosa/g/h en fibra insoluble y 850 μmol glucosa/g/h en fibra soluble de salvado de trigo.

Tabla 6.6 – Producción de glucosa (mmol glucosa/g RLA/h) y capacidad de inhibición de la actividad de α -amilasa (CIAa).

	Muestra	Producción de glucosa (μmol glucosa/g RLA/h)	CIAa (%)
	Control	1.066,2 \pm 6,3 ^{*g}	
	Celulosa	1.017,8 \pm 3,8 ^{**f}	4,1 \pm 0,0 ^a
Judía	Cruda	646,4 \pm 16,1 ^a	39,2 \pm 2,1 ^f
	Cocida	885,7 \pm 21,5 ^c	16,5 \pm 2,4 ^d
	Germinada	933,2 \pm 1,2 ^d	11,9 \pm 0,4 ^c
Lenteja	Cruda	733,8 \pm 24,8 ^b	30,4 \pm 2,1 ^e
	Cocida	968,2 \pm 10,9 ^e	7,9 \pm 1,0 ^b
	Germinada	859,9 \pm 2,2 ^c	19,3 \pm 0,2 ^d

Los valores son medias \pm DE, n=3. Las medias dentro de una columna con diferente superíndice son significativamente diferentes para $P < 0,05$.

CIAa (capacidad de inhibición de la actividad α -Amilasa) = reducción del porcentual de glucosa de la muestra frente al control (sin adición de fibra); RLA: Residuo Libre de Almidón

*En el ensayo con el Control no se añade al sistema ninguno tipo de fibra, es solamente almidón + α -amilasa, sin embargo para comparar con los resultados de los otros ensayos con fibra (expresados en μmol glucosa/g RLA/h) es necesario suponer que fue añadido al control el mismo contenido en gramos de un supuesto material inerte, solamente para efecto de comparación.

** μmol glucosa/g fibra/h

De acuerdo con los resultados de la Tabla 6.6, la cocción reduce notablemente la CIAa en judía (58%) y en lenteja (70%). Benítez (2011) también observó una disminución de la CIAa en muestras sometidas a tratamiento térmico. Asimismo, la germinación no contribuye a aumentar la inhibición de la actividad α -amilasa en judía (reduce 70% la CIAa) y en lenteja (37%), respecto al control. Los resultados sugieren que la actividad de esta enzima está relacionada directamente con la fibra alimentaria (Chau y col., 2003) y con su composición, y que, las muestras crudas de judía de Tolosa y lenteja de La Armuña son capaces de inhibir más eficazmente la actividad amilasa que las muestras sometidas a cocción y germinación.

Las variaciones en la CIAa entre las muestras de RLA de leguminosas sugieren que la inhibición depende del tipo de fibra. El retraso de la actividad α -amilasa por la fibra insoluble puede atribuirse a varios factores como: (1) la concentración de fibra, (2) la presencia de inhibidores en la matriz fibrosa, (3) encapsulación del almidón y de la enzima por parte de la fibra, (4) accesibilidad reducida de la enzima al almidón, (5) adsorción directa de la enzima en la fibra, que conducen a la disminución de la actividad amilasa, (6) la interacción de la enzima con otros componentes de la fibra (por ejemplo algunos tipos de polifenoles), que podrían impedir, en cierta medida, la actividad α -amilasa (Moron y col., 1989; Gourgé y col., 1992; Alasalvar y col., 2001; Liu y col., 2001; Ou y col., 2001; Chau y col., 2003).

El presente estudio demuestra que la fibra puede afectar a la actividad α -amilasa retardando la tasa de producción de glucosa ($\mu\text{mol/g RLA/h}$) de manera más eficiente que la celulosa.

DIGESTIBILIDAD DEL ALMIDÓN (DiAI)

La digestibilidad del almidón (DiAI) es una propiedad que mide simultáneamente el efecto que tiene la fibra sobre la hidrólisis del almidón y la absorción de los productos de la hidrólisis en el intestino. La interferencia de la fibra de leguminosas (RLA) sobre esta propiedad se evalúa por los cambios en los contenidos de glucosa en el dializado en función del tiempo (Tabla 6.7).

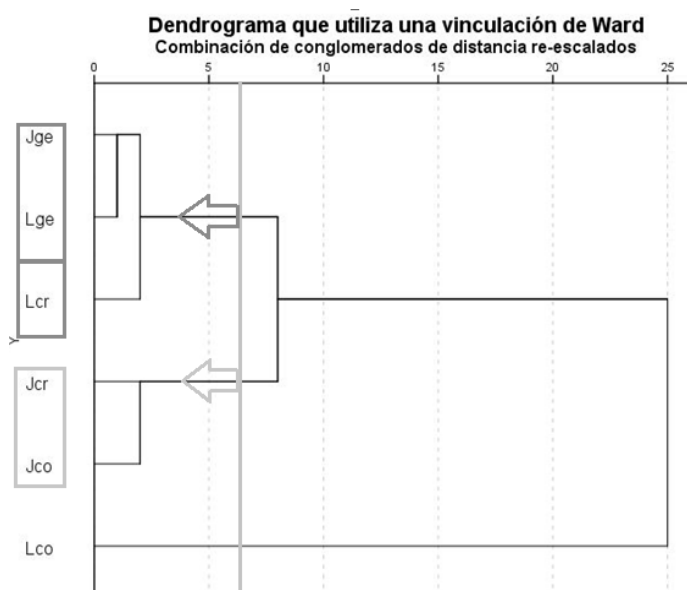
En general, la digestibilidad del almidón es menor en los ensayos que contienen RLA de leguminosas que en el control (sin fibra). Se aprecia que la muestra cruda de lenteja presenta una mayor tendencia en reducir la digestibilidad del almidón que la judía cruda. Los resultados observados son superiores al RIA de carambola (Chau y col., 2004b), mientras que son inferiores a fibra RIA de naranja (Chau y col., 2003).

Tabla 6.7 – Capacidad de digestibilidad del Almidón (μmol) de leguminosas crudas y procesadas.

		Glucosa en el dializado (μmol)						
Muestra		10 min	20 min	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
Control		$7,0 \pm 0,2^e$	$14,5 \pm 0,2^g$	$25,4 \pm 0,9^e$	$46,8 \pm 2,3^b$	$66,0 \pm 2,8^b$	$77,1 \pm 3,3^{bc}$	$110,5 \pm 7,4^{ab}$
Celulosa		$6,6 \pm 0,3^e$	$12,0 \pm 0,1^f$	$20,3 \pm 0,7^{bcd}$	$41,0 \pm 1,9^a$	$58,8 \pm 2,4^a$	$68,5 \pm 3,0^a$	$99,0 \pm 6,6^a$
Judía	Cruda	$4,1 \pm 0,1^b$	$11,5 \pm 0,1^e$	$21,3 \pm 0,7^{cd}$	$39,5 \pm 1,9^a$	$57,0 \pm 2,3^a$	$72,0 \pm 3,1^{ab}$	$104,0 \pm 7,1^{ab}$
	Cocida	$5,1 \pm 0,1^d$	$9,3 \pm 0,1^a$	$19,3 \pm 0,7^b$	$38,5 \pm 1,8^a$	$62,0 \pm 2,5^{ab}$	$74,0 \pm 3,5^{ab}$	$107,0 \pm 7,1^{ab}$
	Germinada	$4,1 \pm 0,1^b$	$11,0 \pm 0,1^d$	$19,5 \pm 0,7^{bc}$	$39,8 \pm 1,8^a$	$56,9 \pm 2,3^a$	$68,0 \pm 2,8^a$	$93,5 \pm 6,4^a$
Lenteja	Cruda	$3,3 \pm 0,1^a$	$11,0 \pm 0,1^{cd}$	$17,4 \pm 0,6^a$	$39,3 \pm 1,8^a$	$56,2 \pm 2,3^a$	$67,0 \pm 2,8^a$	$99,5 \pm 6,4^{ab}$
	Cocida	$4,6 \pm 0,1^c$	$10,5 \pm 0,1^{bc}$	$22,0 \pm 0,8^d$	$47,3 \pm 2,6^b$	$67,8 \pm 2,8^b$	$83,8 \pm 3,7^c$	$116,5 \pm 7,8^b$
	Germinada	$3,3 \pm 0,1^a$	$10,3 \pm 0,1^b$	$19,5 \pm 0,7^{bc}$	$41,4 \pm 2,0^a$	$57,0 \pm 2,3^a$	$68,0 \pm 3,0^a$	$94,4 \pm 6,4^a$

Los valores son medias \pm DE, $n=3$. Las medias dentro de una columna con diferente superíndice son significativamente diferentes para $P<0,05$. RLA: Residuo Libre de Almidón; control (sin adición de fibra).

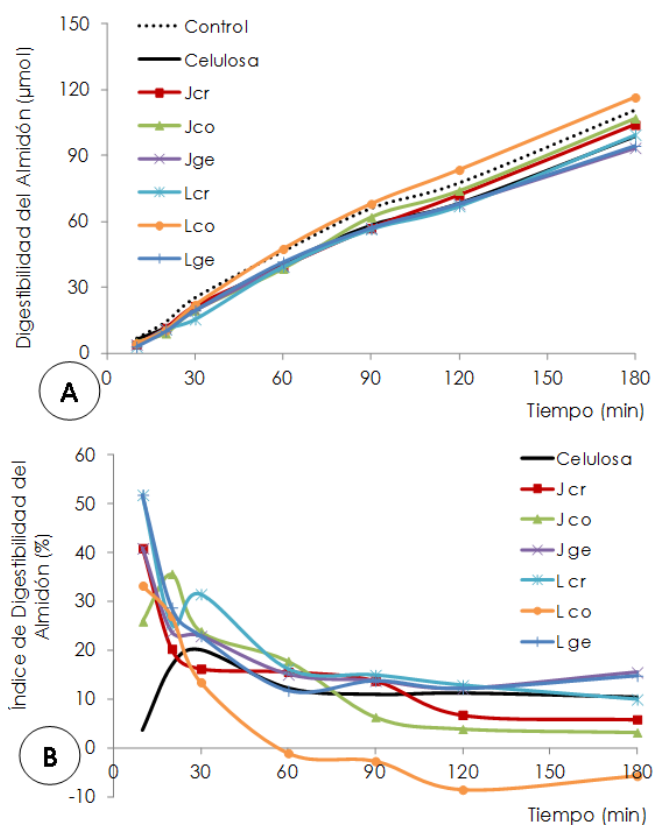
Observando los resultados de las muestras sometidas a cocción se aprecia que en ambas leguminosas hay una tendencia a incrementar la digestibilidad del almidón con el tratamiento térmico, aunque en el caso de lenteja estos aumentos son más considerables. En cuanto al proceso de germinación, apenas se notan cambios. Estas relaciones pueden ser confirmadas según el dendrograma (Figura 6.12), donde se aprecia la formación de dos grupos principales: las muestras de judía germinada, lenteja germinada y lenteja cruda; y las muestras de judía cruda y judía cocidas. Aislada de las otras muestras, se encuentra la lenteja cocida debido a que sus resultados de DG son los más altos observados.



Jcr: judía cruda; Jco: judía cocida; Jge: judía germinada; Lcr: lenteja cruda; Lco: lenteja cocida; Lge: lenteja germinada

Figura 6.12 – Dendrograma de la Digestibilidad del Almidón de leguminosas crudas y procesadas.

De acuerdo con la Figura 6.13A, tanto el RLA de muestras crudas como procesadas, así como la celulosa, afectan a la digestibilidad del almidón, excepto la fibra de lenteja cocida que parece no influir en esta digestibilidad, presentando valores muy próximos al control.



Jcr: judía cruda; Jco: judía cocida; Jge: judía germinada; Lcr: lenteja cruda; Lco: lenteja cocida; Lge: lenteja germinada; Control: sin fibra; IDiAl (%) = $100 - [\text{contenido de glucosa en el dializado (sistema con muestra)} / \text{contenido de glucosa en el dializado (sistema control)} \times 100]$

Figura 6.13 – (A) Influencia del RLA de leguminosas en la digestibilidad del almidón (μmol); (B) Índice de digestibilidad del almidón IDiAl (%).

Índice de digestibilidad del almidón (IDiAl)

El índice de digestibilidad del almidón (IDiAl) mostrado en la Figura 6.13B, proviene de la actividad α -amilasa sobre almidón. Se puede observar que las muestras de RLA presentan sus mayores valores de IDiAl a los 10 minutos, indicando que, en el inicio de la diálisis, el RLA tienen una mayor capacidad de inhibir la actividad α -amilasa y disminuir el paso de la glucosa por la membrana semipermeable (entre 25% y 51%). Asimismo, en los 10 primeros minutos de diálisis, el RLA de leguminosas parece ser más eficiente que la celulosa a la hora de reducir la digestibilidad del almidón. A su vez, se aprecia que la fibra de la lenteja cocida a los 60 minutos parece no afectar a la difusión de la glucosa, como se justifica en la Figura 6.13A. A los 180 minutos las muestras de leguminosas, excepto lenteja cocida, presentan un índice de digestibilidad del almidón entre 3 y 15%.

Esta inhibición de la digestibilidad que presentan las fibras en los primeros 20 minutos también se observa en la literatura (Ou y col., 2001; Chau y Huang, 2003).

Velocidad máxima de digestibilidad del almidón

La velocidad máxima, estimada a tiempo cero, se observa en la Tabla 6.8. De acuerdo con los resultados, se aprecia que la muestra de lenteja cocida es la que presenta una mayor velocidad inicial de difusión de glucosa (933 mmol/min; 30% superior, respecto a la lenteja cruda). La celulosa, juntamente con las muestras de leguminosas, excepto la lenteja cocida, presentan una menor velocidad de difusión de glucosa respecto al control (sin fibra).

Tabla 6.8 – Velocidad máxima de difusión de glucosa (mmol/min) en la Digestibilidad del Almidón.

Muestra	V _{max} (mmol/min)		
Control	821		
Celulosa	725		
	Cruda	Cocida	Germinada
Judía	718	778	774
Lenteja	719	933	795

Control: sin adicción de fibra.

Por otra parte, en base a las observaciones del presente trabajo es posible determinar también el flujo de glucosa a través de la bolsa de diálisis (mmol glucosa/minuto) como el resultado del cálculo de la velocidad con que la glucosa, proveniente de la actividad α -amilasa sobre el almidón, se difunde a través de la membrana. Los resultados de la Figura 6.14 muestran que, en general, se observa un mayor flujo de glucosa a los 30 minutos de diálisis (± 1000 mmol/min), la única muestra que no sigue esta tendencia es la lenteja cruda. El flujo disminuye con el paso del tiempo pareciendo ser constante a partir de los 120 minutos (± 500 mmol /min). El efecto directo de la fibra sobre la actividad α -amilasa, puede ser debido bien a la adsorción de esta enzima en la matriz de la fibra o, bien a un descenso en la actividad debido a la viscosidad que incide en el declive de la velocidad amilolítica. Asimismo, la concentración de fibra o la posible presencia de inhibidores α -amilasa solubles en su matriz pueden influir también en la accesibilidad de la enzima hacia su sustrato (Gourgue y col., 1992).

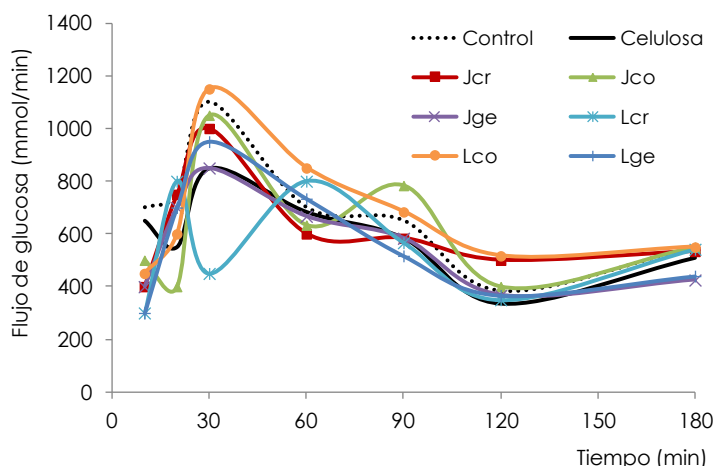


Figura 6.14 – Flujo de glucosa (mmol/min) en la Digestibilidad del Almidón de leguminosas crudas y procesadas.

Estos resultados de flujo de glucosa en la DiAl difieren de la velocidad máxima de DiAl, porque ésta última es un valor estimado a partir de las observaciones del presente trabajo, mientras que el flujo de glucosa en la digestibilidad del almidón son valores observados en el experimento.

En resumen, en base a los resultados de Digestibilidad del Almidón (sistema: α -amilasa + almidón + fibra + membrana) y la Inhibición de α -amilasa (sistema: α -amilasa + almidón + fibra) explicados anteriormente, se puede indicar que el RLA de las muestras cocidas presentan menor capacidad de inhibir la actividad de α -amilasa en ambos experimentos, respecto al control. Además, los resultados de los ensayos con membrana de diálisis probablemente indican que el RLA de las muestras sometidas al tratamiento térmico en ambas leguminosas no mejoran la disminución de la glucosa absorbida por el intestino, comparado a la muestra cruda y germinada.

6.5 CONCLUSIONES PARCIALES

- ✓ Todas las fibras estudiadas adsorben glucosa a diferentes concentraciones, siendo la judía cocida la muestra que presenta mayor capacidad de adsorción de glucosa, a concentraciones de glucosa entre 10 y 300 mM. Por lo tanto, estas fibras podrían ser indicadas como ingredientes en alimentos usados en las dietas especiales.
- ✓ En comparación con el control, se observa que todas las muestras estudiadas, incluida la celulosa, provocan un retraso en la difusión de glucosa hacia el exterior a través de la membrana de diálisis.

- ✓ La actividad α -amilasa se ve reducida en presencia del Residuo Libre de Almidón, tanto en leguminosas crudas como procesadas, retardando la tasa de producción de glucosa de manera más eficiente que la celulosa.
- ✓ El Residuo Libre de Almidón de las leguminosas estudiadas, así como la celulosa, afectan a la digestibilidad del almidón, excepto la fibra de lenteja cocida que parece no influir en esta digestibilidad, presentando valores muy próximos al control.
- ✓ El Residuo Libre de Almidón de las leguminosas estudiadas (crudas y procesadas) presentan importantes propiedades hipoglucémicas, siendo estas fibras más eficientes que la celulosa a la hora de adsorber y difundir glucosa, como también de retardar la actividad α -amilasa y la digestibilidad del almidón, en la mayoría de los casos.

" Una buena comida hace sentir más amor por el mundo
que cualquier sermón."

Arthur Pendenys

Capítulo 7 - CARACTERIZACIÓN DE LAS LEGUMINOSAS PROCESADAS: PROPIEDADES TECNOFUNCIONALES

7



Sofia Sarmento Rosa

Impacto del procesamiento sobre la pared celular y las propiedades
hipoglucémicas y tecnofuncionales | Thaise Rachel Sarmento | 2012

Capítulo 7 - CARACTERIZACIÓN DE LAS LEGUMINOSAS PROCESADAS: PROPIEDADES TECNOFUNCIONALES

7.1 RELEVANCIA DEL ESTUDIO

Identificar y mejorar las propiedades tecno-funcionales específicas de las harinas de las leguminosas es esencial para determinar los posibles usos de las mismas como ingredientes alimentarios. Las propiedades tecno-funcionales proporcionan información sobre cómo se comportaría un ingrediente en particular en la matriz de un alimento, desempeñan un papel destacado durante la preparación, elaboración y almacenamiento de los alimentos y, a su vez, se correlacionan con las propiedades sensoriales. Dichas propiedades podrían ser consideradas como el resultado de los distintos cambios conformacionales o de las distintas interacciones que tienen lugar entre los componentes del alimento, tales como las interacciones entre proteínas, entre proteínas y polisacáridos, lípidos, compuestos fenólicos ó ácido fítico (Ismond y col., 1986; Patane y col., 2004). Una vez analizado el comportamiento de estos componentes en capítulos previos, podremos explicar cómo afectan a las propiedades tecno-funcionales de las leguminosas sometidas a diferentes procesamientos.

Por lo tanto, el estudio de las propiedades tecnofuncionales será de gran utilidad para evaluar la aplicación potencial de estos productos como ingredientes alimentarios.

7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En el presente capítulo se pretende estudiar las propiedades tecnofuncionales en harinas de judía de Tolosa y lenteja de La Armuña, bajo los siguientes objetivos específicos:

- Identificar las propiedades tecnofuncionales específicas de las harinas de las leguminosas para determinar los posibles usos de las harinas de judía de Tolosa y lenteja de La Armuña como ingredientes alimentarios;
- Relacionar los resultados de las propiedades tecnofuncionales de las muestra de leguminosa cruda y procesada con las características de sus componentes estudiados en capítulos previos de la presente tesis;
- Seleccionar el procesamiento más apropiado para obtener un producto que presente importantes características nutricionales con las mejores propiedades tecnofuncionales.

7.3 METODOLOGIA

DENSIDAD APARENTE

La densidad se determina mediante el método descrito por Chau y Huang (2003). En una probeta de 10 ml, previamente pesada, se introduce la muestra de harina de leguminosa que se va compactando tal como se muestra en la Figura 7.1. Se rellena la probeta hasta que la muestra, que tiene que quedar bien compacta, alcanza el volumen de 5 ml, y a continuación se pesa la probeta. La densidad aparente se expresa en gramos de muestra por mililitros.

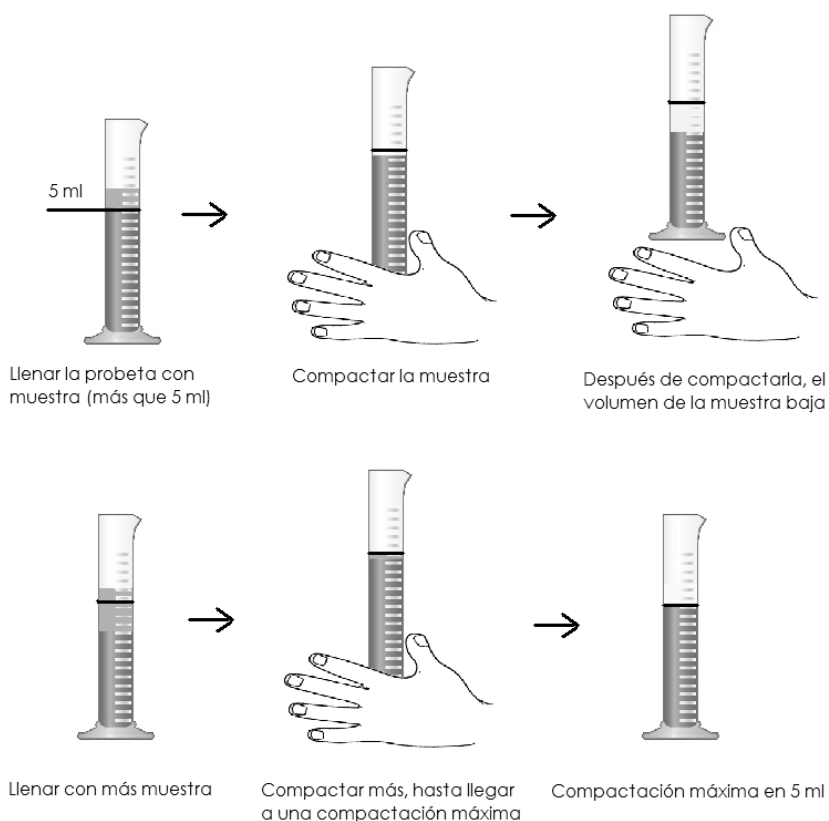


Figura 7.1 – Determinación de la densidad aparente.

El valor de la densidad se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$D \text{ (g/ml)} = \frac{P_t - P_p}{5}$$

Donde:

P_t = Peso total (probeta + muestra), después de la compactación

P_p = Peso de la probeta vacía

DETERMINACIÓN DEL pH

La medida de pH en las muestras se determina a partir de 0,5 g de harina de leguminosa diluidos en 10 ml de agua destilada, se agita durante 10 minutos y se mide el pH utilizando un pH-metro como instrumento de medida (Dzudie y Hardy, 1996).

DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ TOTAL (AcT)

La acidez total (AcT) se determina según el método de la AOAC (1984). La muestra de harina (0,25 g) se mezcla con 10 ml de agua destilada y se agita durante 10 minutos. Se valora con hidróxido de sodio 0,1 N hasta que el pH alcance 8,1. Se mide el volumen utilizado y se expresa la acidez total en gramos del ácido mayoritario (acético) / kg de materia seca.

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE ACEITE (CRAc)

A 0,5 g de muestra de harina de leguminosa se le añaden 5 ml de aceite de girasol en un tubo de centrifuga de 50 ml, y se mantiene en agitación durante 30 minutos en un agitador magnético. Posteriormente, se centrifuga a 4750 rpm durante 30 minutos. Después de centrifugar se mide el volumen del sobrenadante. La diferencia entre el volumen inicial de aceite y el volumen recuperado corresponde a la capacidad de retención de aceite (CRAc) expresada en ml/g de materia seca (Chau y Huang, 2003):

$$CRAc \text{ (ml/g)} = \frac{V_i - V_s}{P_m}$$

Donde:

V_i = Volumen inicial (ml)

V_s = Volumen del sobrenadante (ml)

P_m = Peso de la muestra (g)

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INTERCAMBIO CATIÓNIC (CIC)

Medio gramo de RLA (Residuo Libre de Almidón) (explicado en el Capítulo 3) se suspende en 25 ml de ácido clorhídrico 2 N (4 medidas por muestra: 3 muestras y un blanco) y se mantiene en agitación durante 24 horas, tras las cuales se centrifuga durante 15 minutos a 4500 rpm. El residuo se lava con agua destilada hasta que el pH sea

superior a 4. El residuo lavado se resuspende en 25 ml de cloruro sódico 0,3 M y el otro, que corresponde al blanco, se resuspende en 25 ml de agua destilada. Se mantiene en agitación 24 horas y se centrifuga a 2500 g durante 15 minutos. El sobrenadante se valora con hidróxido sódico 0,01 N. El resultado de la capacidad de intercambio iónico (CIC) se expresa en meq/g RLA (Jiménez y col., 2000):

$$\text{CIC (meq/g)} = \frac{(\text{N}_{\text{NaOH}}) \times (\text{V}_{\text{NaOH}})}{\text{P}_m}$$

Donde:

V_{NaOH} = Volumen del NaOH 0,01N en la valoración (ml)

P_m = Peso de la muestra (g)

N_{NaOH} = Normalidad del NaOH que es 0,01

Al valor encontrado de intercambio catiónico se le sustrae el blanco.

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE GELIFICACIÓN (CG)

Se preparan suspensiones de la muestra de harina de leguminosa al 4, 8, 12, 14, 16, 18 y 20% (p/v), en agua destilada y se introducen en un baño de agua a 100 °C durante 1 hora, y a continuación se traspasan a un baño de hielo durante 1 hora. La capacidad de gelificación se determina como la mínima concentración de gelificación a la que la muestra no se desliza por las paredes al invertir los tubos (Chau y Cheung, 1998).

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD EMULSIONANTE (CEm)

Para analizar la capacidad emulsionante (CEm) se pesa 0,28 g de harina de leguminosa y se le añaden 7 ml de agua destilada y se agita en vórtex (10 segundos). Se añaden 7 ml de aceite de maíz y nuevamente se vuelve a agitar. La muestra se centrifuga durante 1 hora a 4500 rpm. Para realizar la determinación de la capacidad emulsionante se realiza la medición de la capa emulsificada respecto al volumen total (Yasumatsu y col., 1972).

Cálculo de la CEm:

$$\text{CEm (\%)} = \frac{\text{V}_t \times 100}{\text{V}_{ce}}$$

Donde:

V_t = Volumen total

V_{ce} = Volumen de la capa emulsionada

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ESPUMANTE (CEs) Y LA ESTABILIDAD DE LA ESPUMA (EsE)

La capacidad espumante está relacionada con la cantidad de proteínas que tiene la muestra objeto de estudio. Para determinar esta propiedad se pesa 0,5 g de muestra y se añade 25 ml de agua, se agitan en un homogenizador (Politron, velocidad 1) durante 5 minutos y se transfiere la mezcla a una probeta graduada (50 ml), donde se mide la cantidad de espuma inicial, después de 30 segundos, 5, 10, 15, 30, 60 y 120 minutos (Chau y Cheung, 1998) (Figura 7.2).

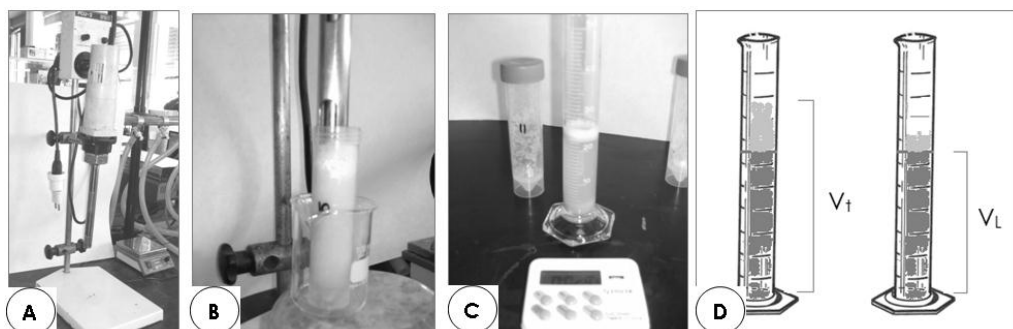


Figura 7.2 – (A) Politron, (B) muestra siendo agitada durante 5 minutos, (C) volumen de espuma medido a intervalos de tiempo y (D) Vt volumen total después de la agitación y VL volumen del líquido (se excluye el volumen de espuma).

Cálculo de la Capacidad Espumante (CE):

$$CE (\%) = (VE_{30''} / VE_0) \times 100 \quad \text{o} \quad CE (\%) = (V_t - VL_{30''}) / (V_t - VL_0) \times 100$$

Donde:

$VE_{30''} = (V_t - VL_{30''})$: Volumen de espuma medido tras 30 segundos de reposo después de haber sido agitada la muestra = V_t [Volumen total (con espuma)] menos $VL_{30''}$ (volumen del líquido después de 30 segundos de reposo).

$VE_0 = (V_t - VL_0)$: Volumen de espuma medido después de la agitación = V_t [Volumen total (con espuma) después de agitar] menos VL_0 (volumen del líquido medido a tiempo cero, después de agitar).

Cálculo de la Estabilidad de la Espuma (EE):

$$EE (\%) = (VE_{tx''} / VE_0) \times 100 \quad \text{o} \quad EE (\%) = (V_t - VL_{tx''}) / (V_t - VL_0) \times 100$$

Donde:

$VE_{tx} = (V_t - VL_{tx})$: Volumen de espuma después del tiempo X (5, 10, 15, 30, 60 y 120 minutos) = V_t [Volumen total (con espuma) después de X minutos] menos VL_{tx} (volumen del líquido después de X minutos).

DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE HIDRATACIÓN

Capacidad de absorción de agua (CA)

Se pesa 1 g de muestra y se le añaden 10 ml de agua destilada, manteniéndose en agitación durante 1 hora. Posteriormente, las muestras se centrifugan a 4500 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante es separado en una probeta graduada (10 ml) donde se mide su volumen y su peso (Beuchat, 1977).

Capacidad de retención de agua (CRA)

A medio gramo de harina de leguminosa se le añaden 5 ml de agua destilada y se mantiene en agitación durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo se centrifuga a 4500 rpm durante 30 minutos. Se mide el volumen del sobrenadante después de centrifugar. La diferencia entre el volumen inicial de agua y el que se recupera después de la centrifugación determina la capacidad de retención de agua (CRA) expresada en mililitros de agua que retiene un gramo de muestra (ml/g) (Chau y Huang, 2003).

La CRA se calcula:

$$CRA \text{ (ml/g)} = \frac{V_i - V_s}{P_m}$$

Donde:

V_i = Volumen inicial de agua destilada (ml)

V_s = Volumen del sobrenadante (ml)

P_m = Peso de la muestra (g)

Capacidad de hinchamiento (CH)

Se pesa 0,1 g de harina de leguminosa en un cilindro graduado de 10 mililitros. Se rellena el cilindro con agua destilada hasta 10 ml. Se apunta el volumen inicial ocupado por la muestra y se agita suavemente y se deja reposar durante 16 horas para que se hidrate. Transcurrido ese tiempo se mide el volumen final que ocupa la muestra (Robertson y col., 2000). La capacidad de hinchamiento (CH) se expresa como:

$$CH \text{ (ml/g)} = \frac{V_f - V_i}{P_m}$$

Donde:

V_f = volumen final ocupado por la muestra (ml)

V_i = Volumen inicial de la muestra (ml)

P_m = peso de la muestra (g)

7.4 RESULTADOS Y DISCUSIONES

DENSIDAD APARENTE (DA)

La densidad aparente de las harinas de leguminosas se muestra en la Tabla 7.1. De acuerdo con los resultados se observa que las muestras crudas de judía y lenteja presentan valores muy próximos a los publicados por otros autores, como en el caso de lenteja Pardina (0,9 g/ml). Estos valores son superiores a harinas de diferentes variedades de judía (0,64 g/ml), de soja (0,47 g/ml) (Chau y Cheung, 1998), de judía Canellini (0,84 g/ml) (Aguilera, 2009) y de otros alimentos como alcachofa (0,74 g/ml) (López y col., 1996) y bagazo de zanahoria (0,62 g/ml) (Chau y col., 2004a).

Tabla 7.1 – Densidad Aparente (DA) (g ms/ml) de harinas de leguminosas crudas y procesadas.

Muestra	Judía	Lenteja
Cruda	$0,95 \pm 0,02^c$	$0,99 \pm 0,02^c$
Cocida	$0,51 \pm 0,02^a$	$0,51 \pm 0,01^a$
Germinada	$0,81 \pm 0,02^b$	$0,76 \pm 0,00^b$

Los valores son medias \pm DE (n=3). Medias dentro de una columna con diferentes letras son significativamente diferentes a $p < 0,05$.

El procesado provoca una disminución en la DA de ambas leguminosas, así en el caso de la cocción se produce una reducción de 47% en la densidad aparente, en ambas leguminosas, mientras que en la germinación la reducción es menor en judía (15%) y en lenteja (23%). Las muestras sometidas a cocción, presentan valores muy inferiores a los observados en muestras cocidas de lenteja Pardina y judía Cannellini y Pinta (0,9 g/ml) (Aguilera, 2009). Sin embargo, según Njintang y col. (2006) se espera que las harinas sometidas a cocción tengan una mayor densidad de estructura como consecuencia de la parcial o completa gelatinización de los gránulos de almidón. Cuanto más baja sea la densidad aparente de un producto mayor es su porosidad, lo que influirá en el resto de propiedades tecnofuncionales, ya que dispondrá de mayor área superficial para unir distintos tipos de sustancias. Además, estará relacionada con una alta capacidad de retener agua y de hinchamiento (Yeh y col., 2005). Por lo tanto, se puede decir que la densidad aparente de las leguminosas es una propiedad que mejora con el procesamiento de cocción y germinación.

DETERMINACIÓN DEL pH

La determinación del pH en las harinas de leguminosas es importante y necesario para entender cómo afectan a algunas propiedades tecnofuncionales que están relacionadas principalmente con las proteínas, como la solubilidad del nitrógeno y la capacidad emulsionante, que dependen en gran medida del pH del medio (McWatters y Cherry, 1977). Los resultados de pH de las muestras crudas de judía de Tolosa y lenteja de La Armuña son 6,5 en ambas muestras (Tabla 7.2). Estos valores son similares a otras leguminosas (Chau y Cheung, 1998) y a lenteja Pardina (Aguilera, 2009), aunque superiores a muestras crudas de otras judías (Martín-Cabrejas y col., 1997).

Tabla 7.2 – Valores de pH de leguminosas crudas y procesadas.

Muestra	Judía	Lenteja
Cruda	6,5 ± 0,0 ^b	6,5 ± 0,0 ^b
Cocida	6,7 ± 0,0 ^c	6,7 ± 0,1 ^c
Germinada	6,4 ± 0,0 ^a	6,2 ± 0,0 ^a

Los valores son medias ±DE (n=3). Medias dentro de una columna con diferentes letras son significativamente diferentes a p<0,05.

El proceso de cocción aumenta el pH (3%) en ambas leguminosas; esta tendencia también fue observado por Aguilera (2009) en muestras cocidas de lenteja Pardina (10%), en judía Cannellini (8%) y judía Pinta (3%). Este aumento se debe probablemente a una solubilización de aminoácidos básicos durante el proceso de cocción al que son sometidas las semillas de leguminosas. Por otro lado, la germinación parece provocar un ligero descenso de pH en la muestra de lenteja, como consecuencia de los cambios metabólicos que tienen lugar durante dicho procesamiento como producción y liberación de metabolitos secundarios y ácidos que descienden el pH de la muestra.

ACIDEZ TOTAL (AcT)

En relación a la acidez total (AcT) (Tabla 7.3) se observa que en ambas muestras de leguminosas crudas el valor alcanzado es de 4,8 g ácido acético/kg ms, que resulta inferior a otras judías (8,5 g ácido acético/kg ms) (Martín-Cabrejas y col., 1997).

Tabla 7.3 – Valores de acidez total (g ácido Acético/kg ms) en leguminosas crudas y procesadas.

Muestra	Judía	Lenteja
Cruda	4,8 ± 0,0 ^a	4,8 ± 0,0 ^b
Cocida	3,0 ± 0,9 ^a	2,4 ± 0,0 ^a
Germinada	10,2 ± 0,9 ^b	13,2 ± 0,0 ^c

Los valores son medias ±DE (n=3). Medias dentro de una columna con diferentes letras son significativamente diferentes a p<0,05.

El procesado afecta significativamente la acidez total. En las muestras sometidas a cocción se observa una importante reducción en la acidez total de judía (38%) y de lenteja (50%). Sin embargo, la germinación incrementa considerablemente este parámetro, aumentando el valor de la acidez total de las leguminosas en casi el triple de su valor observado en la muestra cruda. Estos resultados corroboran las variaciones observadas en los valores de pH.

CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE ACEITE (CRAC)

Esta propiedad indica la capacidad que tiene la matriz del alimento para retener físicamente aceite por atracción capilar, lo que le confiere interesantes propiedades tecnológicas y fisiológicas. La CRAC es una importante propiedad tecnofuncional para la elaboración de alimentos fritos, así como para la estabilidad en su almacenamiento debido a su influencia en el enranciamiento y el desarrollo del poder oxidativo. Estos dos últimos aspectos son de especial interés ya que determinan la aceptación del producto por parte del consumidor.

Los resultados expresados en la Tabla 7.4 muestran la capacidad de retención de aceite (CRAC) en ml/g. De acuerdo con estos resultados se observa que la lenteja cruda presenta valor (1,2 ml/g ms) superior al de la muestra de judía cruda (1,0 ml/g ms). Estos resultados son similares a los encontrados en la literatura (Adebawale y Lawal, 2004; Granito y col., 2007; Aguilera, 2009), aunque superiores a harinas de guisantes (0,69 ml/g ms) (Prinyawiwatkul y col., 1997) y a otras variedades de judía (Betancur-Ancona y col., 2004), e inferiores a soja (1,93 ml/g ms) (Chau y col., 1997), a otros tipos de leguminosas (Chau y Cheung, 1998) y a concentrados de proteína extraídos de leguminosas (Chau y col., 1997; Chel-Guerrero y col., 2002).

Tabla 7.4 – Capacidad de Retención de Aceite (CRAc) (ml/g ms) de leguminosas crudas y procesadas.

Tratamiento	Judía	Lenteja
Cruda	1,0 ± 0,3 ^a	1,2 ± 0,0 ^a
Cocida	2,5 ± 0,1 ^b	2,2 ± 0,2 ^b
Germinada	1,9 ± 0,1 ^b	2,0 ± 0,0 ^b

Los valores son medias ±DE (n=3). Medias dentro de una columna con diferentes letras son significativamente diferentes a P<0,05.

Se observa que el procesado afecta significativamente a la CRAc. Las muestras cocidas son las que presentan mayor capacidad de retención de aceite (2,5 ml/g ms en judía y 2,2 ml/g ms en lentejas), siendo más relevantes en judía con un incremento de más del doble, mientras en lenteja sólo es del 83%, respecto a las muestras crudas. En este sentido, Aguilera (2009) y Benítez (2011) también, observaron ligeros incrementos en la CRAc de muestras tratadas térmicamente (legumbre y cebolla, respectivamente), lo que puede ser debido al descenso de la densidad aparente que acompaña al tratamiento térmico, lo que supondría una mayor área superficial, quedando más expuestos los grupos capaces de adsorber o unir componentes de naturaleza grasa (Yeh y col., 2005). No obstante, otros autores observan que con la elevación de la temperatura se reduce la CRAc (Femenia y col., 2003; Garau y col., 2007; Granito y col., 2007). Probablemente, el mecanismo de la CRAc se debe, por una parte a la retención física de aceite por capilaridad, y por otra parte a la hidrofobicidad de las proteínas que puede jugar un papel importante en la absorción de grasas, es decir, a la presencia de cadenas laterales no polares de aminoácidos que se unen a las cadenas laterales hidrocarbonadas del aceite (Chau y Cheung, 1998; Aguilera, 2009).

Respecto a la germinación, también se observan importantes incrementos en judía (90%) y en lenteja (67%). Se ha encontrado en la literatura (que la germinación incrementa la capacidad de retención de aceite en leguminosas, pero los incrementos no llegaron al 10% (Sangronis y col., 2004). Por lo tanto, la CRAc va a depender de las propiedades de superficie, sobre todo de la densidad de carga y del grosor, así como de la naturaleza hidrofóbica de la partícula de fibra (López y col., 1996; Femenia y col., 1997). En base a los resultados se observa una correlación lineal inversa entre la CRAc y la DA (g ms/ ml) de las muestras ($r = -0,92$ $P < 0,01$). De acuerdo con los resultados se puede afirmar que cuanto menor sea la densidad aparente de la muestra de harina de leguminosa mayor será su CRAc.

Por otra parte, se ha mostrado que las principales variaciones de CRAc entre distintos aperitivos elaborados con diferentes leguminosas (Singh y Seetha, 1993) pueden ser debidas al tamaño de la partícula de harina y al contenido de almidón y de proteína.

Para determinar la posible relación existente entre la capacidad de retención de aceite y el contenido de almidón y proteína se ha realizado una regresión lineal entre los resultados de CRAC y los resultados de almidón disponible (AD) de las muestras crudas y procesadas. Estos análisis revelan que en lenteja hay una relación directa y muy significativa entre estos dos parámetros ($r = 0,98$, $P < 0,01$), lo que indica incrementos en la CRAC cuando las muestras de lenteja presentan mayor contenido de AD. Sin embargo, en las muestras de judía se aprecia baja correlación entre CRAC y AD ($r = 0,20$, $P < 0,01$). Asimismo, la correlación entre la CRAC y el contenido en proteína y fibra de ambas leguminosas no es significativa, lo que indica la baja influencia que estos componentes tienen sobre la capacidad de retención de aceite de las harinas de leguminosas crudas y procesadas.

Se observan importantes valores de CRAC en las harinas de leguminosas que podrían emplearse para mejorar la estabilidad de alimentos con alto contenido de grasas y de emulsiones (Grigelmo-Miguel y Martín-Belloso, 1999) y pueden ser también un interesante ingrediente en productos destinados a ser fritos.

CAPACIDAD DE INTERCAMBIO CATIONICO (CIC)

La capacidad de intercambio catiónico (CIC) está relacionada con la capacidad que presenta principalmente la fibra alimentaria para disminuir la absorción de lípidos en el intestino (Furda, 1990). Los valores encontrados para la CIC (Tabla 7.5) en las muestras crudas de judía y lenteja son 90 meq/kg RLA (Residuo Libre de Almidón). Estos resultados son considerablemente superiores a los obtenidos para la celulosa (11 meq/kg) (Benítez, 2011) e inferiores a otros alimentos como bagazo de zanahoria (771 meq/kg fibra) (Chau y col., 2004a), zanahoria micronizada (600 meq/kg fibra) (Chau y col., 2007) y concentrado de cebolla (188 meq/kg RIA) (Benítez, 2011). La capacidad de intercambio catiónico difiere mucho de un material a otro; las diferencias podrían deberse en parte al método empleado para su determinación. En este sentido, los datos obtenidos en el presente trabajo son muy similares a los referidos por Jiménez y col. (2000) para el RIA de aceitunas (50 - 110 meq/kg RIA), usando el mismo método.

Tabla 7.5 – Capacidad de intercambio catiónico (CIC) de leguminosas crudas y procesadas (meq/kg RLA).

Muestra	Judía	Lenteja
Cruda	90,2 ± 0,3 ^b	90,1 ± 0,2 ^b
Cocida	59,9 ± 0,1 ^a	29,9 ± 0,7 ^a
Germinada	89,9 ± 0,4 ^b	90,2 ± 0,2 ^b

Los valores son medias ±DE (n=3). Medias dentro de una columna con diferentes letras son significativamente diferentes a $p < 0,05$.

El tratamiento térmico afecta significativamente la CIC de las leguminosas objeto de estudio, provocando una importante reducción en judía (33%) y en lenteja (67%). A pesar de la disminución de la CIC, los valores siguen siendo superiores al observado en muestras de cebolla, según los resultados de Benítez (2011). Esta autora observa la misma tendencia de reducción en la CIC cuando las muestras de cebolla son sometidas a pasteurización y esterilización. Esta disminución en la capacidad de intercambio catiónico estaría justificada por la pérdida de ácidos urónicos (AU) durante los procesos de estabilización térmica (Benítez, 2011). A la vista de los resultados obtenidos, se analiza la correlación entre la CIC y el contenido de AU del residuo libre de almidón (mg/g RLA), donde se observa que existe una alta relación entre estos parámetros, para cada una de las leguminosas estudiadas: lenteja ($r = 1$; $P < 0,01$), judía ($r = 0,96$; $P < 0,01$). Estos resultados indican una relación directamente proporcional entre la CIC y el contenido de AU del RLA de las leguminosas. Asimismo, se observa una correlación significativa entre la densidad aparente (DA) y la CIC ($r = 0,84$; $P < 0,01$).

Por otro lado, la germinación no afecta la capacidad de intercambio catiónico, presentando valores del orden de 90 meq/g RLA, lo que sugiere que estas muestras presentan unas propiedades similares a los que exhiben las harinas de leguminosas crudas que pueden ser potencialmente aceptables para influir en la reducción de la absorción de colesterol en el intestino (Chau y Huang, 2003).

CAPACIDAD DE GELIFICACIÓN (CG)

La capacidad de gelificación (CG) es una propiedad inversa a la Mínima Concentración de harina a la cual tiene lugar la Gelificación (MCG). Es una propiedad físico-química que está asociada a la proporción de los diferentes constituyentes tales como proteínas, carbohidratos y lípidos de las harinas. Un bajo valor de MCG indica una mejor CG (Figura 7.3).

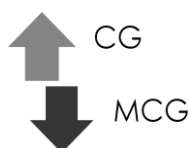


Figura 7.3 – Relación inversa entre la capacidad de gelificación (CG) y la mínima concentración de material para gelificarse (MCG). Cuanto menor la MCG mayor es la CG.

A diferencia de la gelatina que puede formar geles a una concentración del 1 a 2% (p/v) de proteína, las leguminosas requieren una concentración del 10-20% p/v y temperatura mayor de 70°C (comparado con la gelatina, 4°C). Los resultados obtenidos (Tabla 7.6) muestran cómo las muestras crudas de judía y lenteja necesitan una concentración del 12% (p/v) para poder formar un gel estable. Los resultados para muestras crudas son similares a los encontrados en la bibliografía (Sangronis y col., 2004; Aguilera, 2009) en harinas crudas de judía común. No obstante, se aprecia que lenteja Pardina (Aguilera, 2009) y judía Lima (Granito y col., 2007) presentan mayor capacidad de gelificación (7%), mientras que otros tipos de judía (Adebowale y Lawal., 2004) tienen una menor capacidad de gelificación (15%) comparadas con las muestras crudas de judía de Tolosa y lenteja de La Armuña, en el presente trabajo.

Tabla 7.6 – Mínima concentración de harina a la cual tiene lugar la gelificación (MCG) (%) de leguminosas crudas y procesadas.

Muestra	Judía	Lenteja
Cruda	12	12
Cocida	16	22
Germinada	12	8

Los valores son medias \pm DE (n=3). Medias dentro de una columna con diferentes letras son significativamente diferentes a $p < 0,05$.

Se aprecian cambios relevantes para cada uno de los procesamiento realizados en las leguminosas estudiadas. Estas variaciones entre las distintas leguminosas parecen estar relacionadas con el contenido de globulinas las cuales tienen alta facilidad de formar geles (Sathe y Salunkhe, 1981; Sathe y col., 1982). La cocción afecta significativamente la CG causando un aumento en los valores de MCG en muestras de judía (33%) y de lenteja (83%) y consecuentemente reduciendo la CG. Granito y col. (2007) indicaron incrementos del orden de 100% durante el proceso de cocción, al duplicar el valor de MCG hasta reducir sus valores de CG en un 12%. Por tanto, el tratamiento térmico perjudica la capacidad de gelificación de harinas de leguminosas con acusadas disminuciones que podrían estar relacionadas con el comportamiento que ciertos

componentes ejercen en dicha propiedad, tales como proteínas, lípidos y carbohidratos (Adebawale y Lawal, 2004).

Así lo indican los resultados del análisis de regresión lineal establecido entre la fracción proteica y la MCG de las muestras de lenteja ($r = 0,91$; $P < 0,01$), siendo menos significativa en judía ($r = 0,76$; $P < 0,01$). Con base en estos resultados se podría afirmar que cuanto mayor sea el contenido de proteínas de harinas de leguminosas menor será su capacidad de gelificación. Aguilera (2009) encontró similar tendencia entre el contenido de proteínas totales y la CG en garbanzo Sinaloa y lenteja Pardina. Estos resultados son contradictorios respecto a las conclusiones de Kinsella (1979) y Singh (2001), en las que afirma que el factor crítico para la formación y firmeza de gel es la concentración de proteínas; sin embargo, Prinyawiwatkun y col. (1997) afirman que no es necesaria una alta solubilidad proteica para que el gel se forme. Sathe y Salunkhe (1981) observaron que la gelificación no solo dependía de la cantidad de proteína, sino también del tipo de proteína y de los componentes no proteicos. Durante la cocción, tiene lugar desnaturalización y agregación de proteínas, por tanto, aparecen fuerzas repulsivas y atractivas debido a las cargas superficiales de los diferentes grupos funcionales que se exponen como consecuencia del desplegamiento de la proteína durante el tratamiento térmico (Singh, 2001).

La gelificación de las harinas de leguminosas es esencial en la preparación y aceptación de muchos alimentos. Los mecanismos que tienen lugar durante la gelificación son fundamentalmente controlados por el equilibrio entre interacciones hidrofóbicas atractivas e interacciones electrostáticas repulsivas. Del mismo modo, la capacidad de gelificación se ve influenciada por la competición física por el agua entre la proteína que gelifica y el almidón que se gelatiniza. Es probable que en las harinas de leguminosas predomine la relación entre la CG y el almidón, ya que se observa una gran influencia en el contenido de almidón resistente (mg/g ms) y esta propiedad en judía ($r = 0,87$; $P < 0,01$) siendo más acentuada en lenteja ($r = 0,98$; $P < 0,01$). A la vista de estos resultados se puede deducir que cuanto mayor sea el contenido de almidón resistente mayor será el valor de la MCG, lo que significaría una pérdida de la CG en muestras con altos contenidos de almidón resistente y de proteína, como se ha explicado anteriormente.

Referente a la germinación, ésta provoca una reducción en los valores de la MCG en lenteja, es decir, una clara mejoría de la CG, mientras que en judía no se observan cambios. Sangronis y col. (2004) también observaron un aumento en la capacidad de gelificación en muestras sometidas a germinación, y además, Hsu y col. (1982) observaron que la germinación afecta las características de gelificación en diferentes leguminosas. Por lo tanto, se puede afirmar que la germinación contribuye a mejorar las

propiedades de gelificación en harinas de leguminosas, principalmente en lenteja de La Armuña.

Por otro lado, según la bibliografía (Singh, 2001) el pH de las matrices de los alimentos que está relacionado con el contenido de proteínas tiene un efecto importante sobre las reacciones de gelificación, ya que influye en el balance de residuos polares y no polares. A pHs cercanos al punto isoelectrico las interacciones proteína-proteína se ven favorecidas ya que la carga neta de superficie proteica es cercana a cero, lo cual reduce significativamente las interacciones repulsivas entre moléculas de proteína. Sin embargo, a pHs alejados del punto isoelectrico, la carga neta de la superficie de la proteína es alta y existen fuerzas repulsivas entre proteínas. Según los resultados del presente trabajo se observan valores bajos de MCG a pHs básicos, lo que indica una mejor capacidad de gelificación a éstos pHs (Figura 7.4).

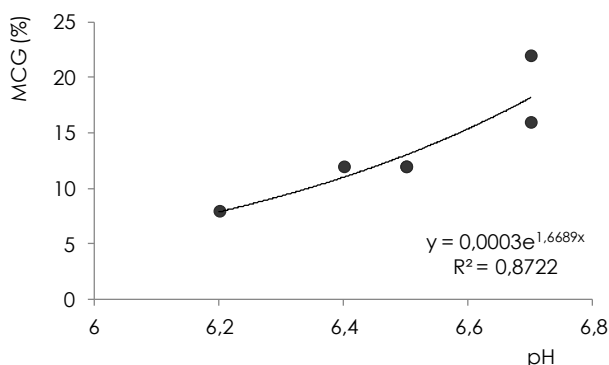


Figura 7.4 – Relación entre la mínima concentración de gelificación (MCG) y el pH de las muestras de leguminosas crudas y procesadas.

CAPACIDAD EMULSIONANTE (CEm)

La Tabla 7.7 muestra los resultados obtenidos en la medida de la CEm en las harinas crudas y procesadas de leguminosas. La muestra cruda de lenteja presenta mayor estabilidad de la capacidad emulsionante (8,5%), dando lugar a una suspensión viscosa en agua a temperatura ambiente más estable que en judía con un valor inferior (3,8%). Estos resultados son próximos a los de productos a base de soja (Yasumatsu y col., 1972), canavalia (Chel-Guerrero y col., 2002; Betancur-Ancona y col., 2004) y judías Pinta y Cannellini (Aguilera, 2009), a pesar de que son muy inferiores a otras publicaciones (Chau y col., 1997; Chau y Cheung, 1998; Adebowale y Lawal, 2004; Sangronis y col., 2004). Estas diferencias en los resultados pueden ser atribuidas al empleo de otras metodologías, o a

la proporción de las fracciones de fibra en la que se encuentran cada una de las legumbres (Betancur-Ancona y col., 2004).

Tabla 7.7 – Capacidad Emulsionante (CEm) (%) de leguminosas crudas y procesadas.

Muestra	Judía	Lenteja
Cruda	3,8 ± 0,4 ^a	8,5 ± 0,6 ^b
Cocida	6,4 ± 0,7 ^b	3,6 ± 0,1 ^a
Germinada	8,0 ± 0,0 ^c	3,3 ± 0,0 ^a

Los valores son medias ±DE (n=3). Medias dentro de una columna con diferentes letras son significativamente diferentes a P<0,05.

Los procesamientos tanto térmico como de germinación afectan de distinta forma a cada una de las leguminosas. En judía se observa un incremento de la capacidad emulsionante tanto en la cocción (68%) como en la germinación (más del doble) respecto a la muestra cruda. Sin embargo, cuando la CEm es relativamente alta podría ser atribuido a los niveles más altos de proteínas solubilizadas (Chau y Cheung, 1998). Las muestras procesadas de lenteja presentan una reducción en la CEm en la muestra sometida a cocción (58%) y aún más significativa en la muestra germinada (61%). Por lo tanto, el procesado de las harinas de judía y lenteja provoca drásticos cambios de la CEm, lo que nos indica que esta capacidad tecnofuncional es sensible tanto al tratamiento térmico como a la germinación. Las interacciones que se producen entre los diferentes componentes de las harinas influyen en sus propiedades y, por lo tanto, son las responsables de las variaciones que tienen lugar durante el procesado.

Asimismo, las diferencias de CEm en las leguminosas estudiadas también pueden ser debidas al diferente nivel de proteínas solubilizadas, lo que puede influir en la CEm modificando el balance de fuerzas atractivas de Van der Waals y electrostáticas repulsivas (McWatters y Holmes, 1979; Adebowale y Lawal, 2004). Sin embargo, al establecer el análisis de correlación lineal en las legumbres objeto estudio entre la CEm y la proteína total (g/100 g ms) no se observa ninguna correlación significativa ($r = -0,18$, $P < 0,01$). Sin embargo, no sólo se atribuye a las proteínas la capacidad de formar enlaces, sino que existen otros componentes de naturaleza no protéica como los carbohidratos que también pueden contribuir substancialmente. Es el caso del almidón disponible, mostrando una correlación inversa tanto en judía ($r = -0,95$, $P < 0,01$) como en lenteja ($r = -0,91$, $P < 0,01$), lo que pone de manifiesto la gran influencia que la fracción amilácea ejerce sobre esta propiedad tecnofuncional.

Además, cabe destacar la significativa correlación entre la CEm y la fracción fibrosa de judía ($r = 0,93$; $P < 0,01$) y lenteja ($r = 0,80$; $P < 0,01$). De acuerdo con las correlaciones entre la CEm y el contenido de fibra alimentaria se puede predecir que cuanto mayor sea el

contenido de fibra mayor es la capacidad emulsionante de la muestra de leguminosas. Por lo tanto, se puede decir, que la matriz amilácea y fibrosa interfieren en la capacidad emulsionante de muestras de leguminosas crudas y procesadas.

CAPACIDAD ESPUMANTE (CEs) Y ESTABILIDAD DE LA ESPUMA (EEs)

La capacidad espumante (CEs) expresa el volumen de espuma producido después de ser agitada vigorosamente la muestra con agua durante 5 minutos, tras el cual se mide el volumen de espuma a los 30 segundos después de la agitación frente al volumen de espuma inicial (tiempo cero). En base a los resultados expresados en la Tabla 7.8, se observa que las harinas de leguminosas crudas presentan valores de CEs muy similares entre sí (117%), y semejante a soja (116%) (Chau y Cheung, 1998), pero muy superiores a otras legumbres (Chau y col., 1997; Cheu-Guerrero y col., 2002; Adebowale y Lawal, 2004; Sangronis y col., 2004; Aguilera, 2009). Las CEs elevadas pueden ser atribuidas al aumento de flexibilidad de la proteína, la cual se difunde más rápidamente en la interfase aire-agua encapsulando partículas de aire y favoreciendo así la formación de espuma (Aluko y Yada, 1995). Por otro lado, algunos autores sugieren que CEs elevadas pueden estar directamente relacionadas con la solubilidad del nitrógeno de las harinas de leguminosas (Singh, 2001).

Tabla 7.8 – Capacidad Espumante (CEs) en % de leguminosas crudas y procesadas.

Muestra	Judía	Lenteja
Cruda	116,7 ± 7,9 ^b	117,1 ± 11,2 ^b
Cocida	108,4 ± 11,8 ^b	79,1 ± 5,9 ^a
Germinada	73,1 ± 6,2 ^a	90,3 ± 8,4 ^a

Los valores son medias ±DE (n=3). Medias dentro de una columna y leguminosa con diferentes letras son significativamente diferentes a p<0,05.

El procesado afecta en distinta forma a la capacidad espumante de las leguminosas; así, la cocción en judía y lenteja provoca reducciones en la CEs, pero sólo siendo significativa en la lenteja (32%). Estos resultados están en concordancia con investigaciones previas (Diwakar y col., 1996; Chel-Guerrero y col., 2002; Granito y col., 2007), observándose reducciones más acusadas en muestras cocidas de lenteja Pardina (50%) que en judía Pinta y judía Cannellini (25% en ambos casos) (Aguilera, 2009). Los valores inferiores de CEs que presentan las muestras cocidas pueden ser principalmente debidos a los cambios de configuración que sufren las proteínas al ser expuestas a altas temperaturas. Las moléculas de proteínas flexibles presentan una excelente capacidad de formar espumas, sin embargo, las moléculas ordenadas globulares presentan una menor CEs porque éstas son incapaces de reducir la tensión superficial de la interfase

aire-agua (Aguilera, 2009). Las muestras sometidas a un tratamiento de cocción, consiguen una menor solubilización de las proteínas debido a una mayor desnaturalización de las mismas, lo que provoca una reducción de la CE, tal y como lo pone de manifiesto el trabajo de Yasumatsu y col. (1972). La germinación también reduce significativamente la capacidad espumante en judía (37%) y en lenteja (23%) respecto a las muestras crudas. Sin embargo, en la bibliografía también se observan incrementos en la capacidad espumante de judías germinadas, por lo que la variedad y procedencia de la leguminosa pueden influir en los valores de CE (Sangronis y col., 2004).

La estabilidad de la espuma (EEs) se calcula en función del tiempo (0, 5, 10, 15, 30, 60 y 120 minutos) y muestra su permanencia con el paso del tiempo (Figura 7.5A y B). Se observa que la tendencia general en ambas leguminosas es disminuir la capacidad espumante con el paso del tiempo, y por lo tanto su estabilidad. En las muestras crudas se aprecia que lenteja presenta mayor estabilidad de la espuma ya que ésta se reduce en un 36% a las 2 horas de experimento, mientras que en judía cruda se observa que después de 2 horas el volumen de la espuma sufre una disminución de 51%. Estos resultados coinciden con Cheu-Guerrero y col. (2002) que observaron reducciones del orden de 50% a las dos horas de experimento respecto a la medida de EE a los 5 min, en concentrado de proteína de judía Lima.

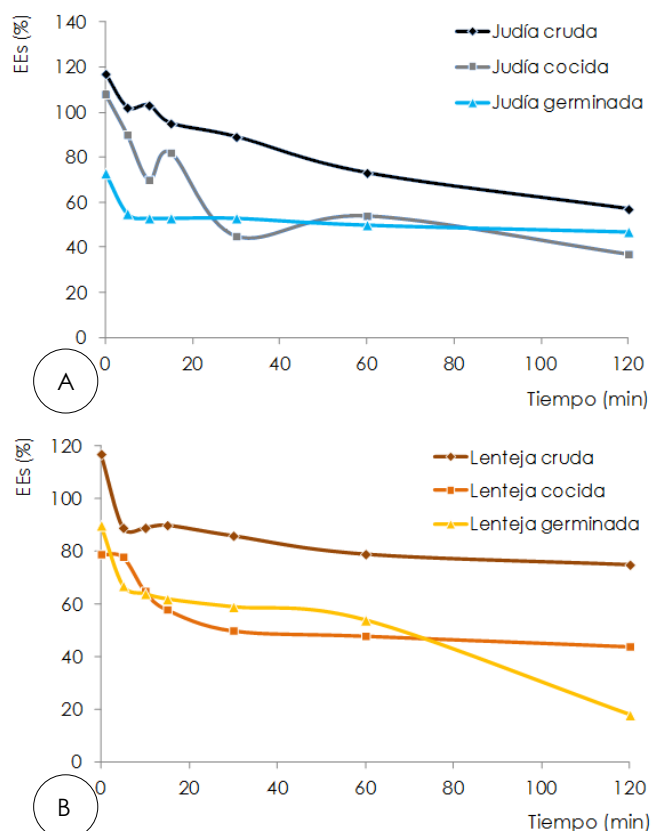


Figura 7.5 – Estabilidad de la espuma (EEs) en leguminosas crudas y procesadas (%). (A) Judía de Tolosa. (B) Lenteja de La Arnuña.

En general, los procesamientos causan pérdidas en la estabilidad de la espuma, en ambas leguminosas respecto al control. Asimismo, el procesamiento térmico causa mayores pérdidas en la estabilidad de la espuma principalmente a los 30 minutos tanto en judía (49%) como en lenteja (42%). Sin embargo, la germinación provoca en judía mayores reducciones a los 10 minutos (49%), mientras que en lenteja a los 120 minutos (76%), respecto a las muestras crudas.

Asimismo, judía germinada y lenteja cruda son las muestras más estables entre todas, ya que presentan una tendencia constante, a partir de los 5 minutos de ensayo, indicando que se trata de la muestra más estable, como se puede observar también en la Figura 7.6A y B, donde se observan las pérdidas en la estabilidad espumante con el paso del tiempo respecto a la medida inicial (tiempo 30 segundos). Cuando los valores de la estabilidad de la espuma no difieren mucho entre sí puede ser debido a la mayor

estabilidad de las conformaciones de las proteínas en sus puntos isoeléctricos (Chau y Cheung, 1998).

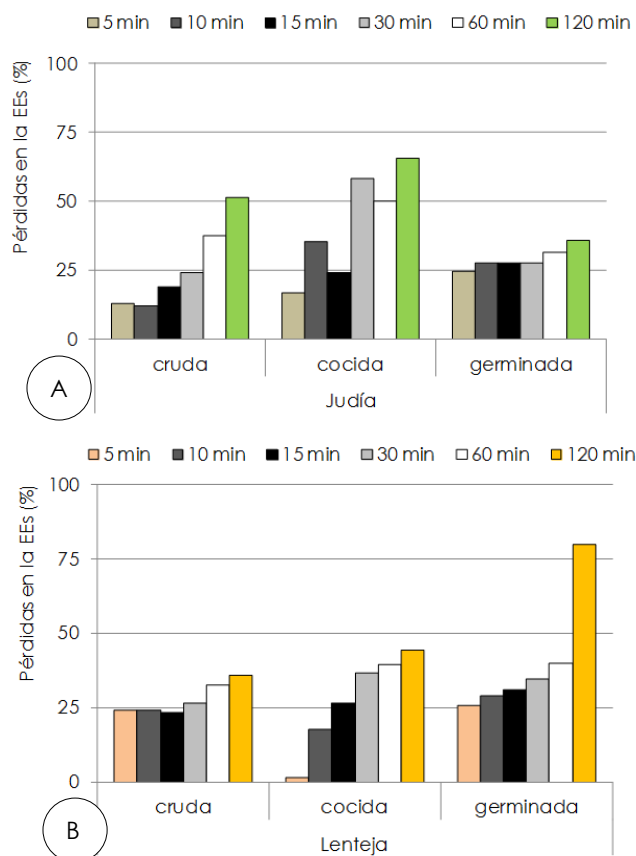


Figura 7.6 – Pérdidas en la estabilidad espumante (EEs), de leguminosas crudas y procesadas. (A) Judía de Tolosa. (B) Lenteja de La Armuña.

En base a los resultados obtenidos se puede decir que la harina de lenteja cruda reúne mejores características cuanto a la producción de espuma, debido a su buena capacidad espumante y óptima estabilidad de la espuma comparada con las muestras de harina de judía cruda. En relación a las muestras cocidas y germinadas exhiben EEs inferiores, aunque parece que las harinas germinadas son más estables desde el punto de vista tecnológico.

PROPIEDADES DE HIDRATACIÓN

Las propiedades de hidratación están relacionadas con la habilidad de los alimentos para retener agua dentro de su matriz (Figuerola y col., 2005) y éstas pueden influir en el

éxito de la incorporación de materiales enriquecidos en fibra a los alimentos (Femenia y col., 1997).

La composición química de la fibra y las características físicas de los alimentos influyen en las propiedades de hidratación. Las fibras, compuestas principalmente de paredes celulares primarias, presentan en general valores más altos que las fibras compuestas principalmente de las paredes celulares secundarias. Procesos como molienda, secado, calentamiento y extrusión modifican las propiedades físicas de la matriz de fibra, y por tanto afectan a las propiedades de hidratación. Las condiciones de pH, fuerza iónica y naturaleza de los iones pueden influir en los valores de hidratación, así como, la constante dieléctrica de la solución y la del medio (Guillon y Champ, 2000).

Las propiedades de hidratación estudiadas en este capítulo son la capacidad de absorción de agua (CAA), la capacidad de retención de agua (CRA) y la capacidad de hinchamiento (CH), ya que proporcionan una valiosa información sobre el comportamiento de leguminosas respecto a la hidratación y a su posible utilización en la suplementación de otros productos alimenticios.

Capacidad de absorción de agua (CAA)

Desde el punto de vista tecnológico, la capacidad de absorción de agua (CAA) representa la habilidad de un alimento para absorber agua durante la adición gradual de la misma en su preparación a lo largo de un período corto de tiempo tras la aplicación de una fuerza externa. La CAA en muestras de leguminosas crudas (Tabla 7.9) presenta valores muy próximos tanto en judía (1,8 ml/g ms) como en lenteja (1,6 ml/g ms), siendo similares a otras variedades de judía (2,0 ml/g) (Adebowale y Lawal, 2004; Sangronis y col., 2004) y a lenteja Pardina (1,8 ml/g ms) (Aguilera, 2009). Estos resultados son inferiores a los valores de frijoles verdes (2,1 ml/g) (Dzudie y Hardy, 1996), de canavalia (5,1 ml/g) (Adebowale y Lawal, 2004) y de judía Pinta (2,7 ml/g) (Aguilera, 2009).

Tabla 7.9 – Capacidad de Absorción de Agua (CAA) (ml/g ms) de leguminosas crudas y procesadas.

Muestra	Judía	Lenteja
Cruda	1,8 ± 0,0 ^a	1,6 ± 0,0 ^a
Cocida	3,0 ± 0,3 ^b	5,2 ± 0,0 ^c
Geminada	2,7 ± 0,2 ^b	2,2 ± 0,0 ^b

Los valores son medias ±DE (n=3). Medias dentro de una columna con diferentes letras son significativamente diferentes a P<0,05.

Sin embargo, se aprecia un importante incremento en la CAA en ambas leguminosas cuando éstas se someten al tratamiento térmico o al proceso de germinación. La cocción provoca incrementos más acentuados en lentejas (más del triple del valor observado en la muestra cruda de esta leguminosa) que en judía (67%). Estos aumentos son similares a los encontrados en la bibliografía (Granito y col., 2007; Aguilera, 2009).

Respecto al proceso de germinación, éste provoca incrementos más discretos en la capacidad de absorción de agua en judías (50%) y en lenteja (38%), que son similares a otras variedades de judía (40 - 60%) (Sangronis y col., 2004). Deshpande y col. (1982) indicaron que la CAA de una muestra se atribuye exclusivamente al contenido proteico, ya que la presencia de componentes no proteicos puede también influir sobre esta propiedad tecnofuncional. Tal capacidad depende de las interacciones proteína-agua y agua-agua, y de la capilaridad del alimento, ya que una mayor CAA se puede atribuir a la retención física de agua por acción capilar en la nueva estructura formada por agregación de las proteínas (Mwasaru y col., 1999). Sin embargo, al realizar un análisis de correlación lineal entre la CAA y la proteína, no se observaron destacadas correlaciones ($r = 0,50$; $P < 0,01$). Asimismo, la presencia de carbohidratos en la harina también puede contribuir al incremento de la CAA (Inyang y Nwadiukpa, 1992). Según Oshodi y Adeladun, (1993), leguminosas con altos contenidos de fracciones amiláceas y de fibra presentan un mayor valor de CAA.

La relación del almidón total, de la capacidad de intercambio catiónico (CIC) y de la densidad aparente (DA) con la CAA se pone de manifiesto en las leguminosas estudiadas. Aumentos en la CIC y DA durante el procesamiento industrial van a provocar disminución en la capacidad de absorción de agua, destacando las correlaciones en las leguminosas estudiadas entre la CAA y la CIC ($r = -0,93$; $P < 0,01$) y en menor medida con DA ($r = -0,82$; $P < 0,01$), en las muestras de judía y lenteja juntas. Además, en lenteja de La Armuña se observa una alta correlación entre la CAA y el almidón total ($r = 0,99$; $P < 0,01$), lo que indica que cuanto mayor los niveles de almidón mayor será la CAA en las muestras de esta leguminosa. Durante la cocción se va a producir una gelatinización de los gránulos de almidón, acompañado de una ruptura molecular, que va a dar lugar a pérdidas del nivel de cristalización y a un incremento de la capacidad de unirse al agua (Bemiller, 1977). No obstante, Granito y col. (2007) justifican los incrementos que se producen en la CAA durante la cocción no sólo por la gelatinización del almidón, sino también como consecuencia de la absorción de agua por parte de la fibra alimentaria y de la disociación de proteínas, dando lugar a una mayor exposición de los grupos polares en las cadenas peptídicas, aumentando así la fijación de las moléculas de agua.

Capacidad de retención de agua (CRA)

La capacidad de retención de agua está muy relacionada con la fibra dietética del alimento, e informa sobre algunos de sus efectos fisiológicos (aumento de volumen fecal por la fibra de la dieta). Los resultados de la capacidad de retención de agua (CRA) a temperatura ambiente y pH neutro en muestras crudas y procesadas se presentan en la Tabla 7.10. Asimismo, la imbibición de agua es una propiedad tecnofuncional muy importante en la preparación de alimentos como salchichas, salsas y masas. En estos alimentos, las proteínas retienen agua, pero no se disuelven debido a la insuficiente cantidad de agua. Por lo tanto, pueden gelificar e impartir características tales como dar consistencia a la matriz del alimento y espesar.

Los valores obtenidos de CRA muestran que en leguminosas crudas los valores son bastante semejantes, aunque la judía presenta una capacidad de retención de agua ligeramente mayor (2,7 ml/g). Estos resultados son similares a los encontrados en la bibliografía para leguminosas como la judía Pinta (2,7 ml/g) (Aguilera, 2009), judía Lima (2,7 ml/g) (Chel-Guerrero y col., 2002). Sin embargo, se han encontrado trabajos que apuntan valores más altos de CRA en otras judías (5,10 ml/g) y soja (3,5 ml/g) (Chau y col., 1997), en lenteja Pardina (3,20 ml/g) y judía Cannellini (3,50 ml/g) (Aguilera, 2009).

Tabla 7.10 – Capacidad de Retención de Agua (CRA) (ml/g ms) en leguminosas crudas y procesadas.

Muestra	Judía	Lenteja
Cruda	2,7 ± 0,1 ^a	2,1 ± 0,1 ^a
Cocida	2,7 ± 0,1 ^a	3,8 ± 0,3 ^c
Germinada	2,8 ± 0,2 ^a	2,5 ± 0,1 ^b

Los valores son medias ±DE (n=3). Medias dentro de una columna con diferentes letras son significativamente diferentes a P<0,05.

Respecto a la cocción, se observa un notable incremento en CRA exclusivamente en la muestra de lenteja (81%). Un comportamiento semejante fue observado por Aguilera (2009) en lenteja (47% de incremento); sin embargo, en judía Pinta se observan descensos (7%). La distinta estructura proteica y la presencia de diferentes carbohidratos hidrofílicos podrían ser los responsables de las variaciones observadas en las harinas estudiadas tal como sugiere Adebawale y Lawal (2004). En relación al proceso de germinación, éste provoca incremento significativo sólo en lenteja (19% de aumento).

El hecho de que los resultados de CRA sean menores en las muestras crudas que en las procesadas puede ser atribuido a las mayores densidades que presentan las muestras sin procesar, ya que la CRA está correlacionada con la densidad aparente de forma inversa

(Benítez, 2011). En este caso, solamente en las muestras de lenteja se observa esta relación inversa entre la CRA y la DA ($r = -0,96$; $P < 0,01$). No obstante, hay que recordar que además de la densidad aparente también influye la composición de la fibra y su estructura (Chau y col., 2004a), ya que hay componentes que tienen facilidad para unirse a las moléculas de agua, principalmente los polisacáridos de la fracción insoluble de fibra (Chau y Huang, 2004; Yeh y col., 2005).

Por otra parte, los incrementos observados pueden ser debidos a la disociación de la proteína, lo que provoca que un mayor número de moléculas de agua se unan a los restos polares de las cadenas polipeptídicas. Se ha realizado un análisis de regresión lineal entre la capacidad de retención de agua y la proteína y no se observan correlaciones significativas entre ellas. Además de las proteínas, existen otros compoentes no proteicos como los carbohidratos, que aumentan esta capacidad, tales como el almidón, que se gelatiniza, y la fibra alimentaria, que absorbe agua (Paredes-López y col., 1991; Aguilera, 2009). El incremento de la fibra alimentaria y del almidón disponible que se produce en las harinas de las leguminosas durante la cocción (estudiado en el Capítulo 2), podría influir de manera muy decisiva en los valores de esta propiedad funcional.

Una vez establecidas las correlaciones entre la CRA y el almidón total y la fibra alimentaria en las muestras objeto de estudio, se destaca la gran influencia que ambos componentes ejercen sobre esta propiedad tecnofuncional. La fracción amilácea ejerce una gran influencia en las muestras de lenteja ($r = 0,99$; $P < 0,01$), por lo que cuanto mayor sea el contenido de almidón total (mg/g ms) mayor será la capacidad de retención de agua. Sin embargo, en las muestras de judía es la fracción de fibra alimentaria la que ejerce mayor influencia sobre la CRA ($r = 0,95$; $P < 0,01$) indicando que cuanto mayor sea el contenido en fibra alimentaria (mg/g ms) mayor será la capacidad de retención de agua. Los resultados obtenidos corroboran los observados por Aguilera (2009) en otras variedades de lenteja y judía.

El análisis de correlación lineal establecido entre la capacidad de retención de agua y los distintos componentes alimentarios muestra que la fracción amilácea y la fibra alimentaria ejercen una mayor influencia sobre la CRA que la proteína. Por lo tanto, los resultados destacados de CRA en las muestras cocidas como germinadas de lenteja y judía ponen de manifiesto que estas harinas podrían ejercer un papel relevante en la textura de productos cárnicos, confiriéndoles propiedades de consistencia, viscosidad y adhesión, por lo que se podrían utilizar las harinas de las leguminosas estudiadas en la preparación de productos cárnicos como salchichas o análogos de carne.

Capacidad de hinchamiento (CH)

La capacidad de hinchamiento de leguminosas crudas y procesadas se muestra en la Tabla 7.11. Se aprecia que lenteja cruda presenta una CH muy superior (6,8 ml/g ms) a la muestra cruda de judía (1,6 ml/g ms). Si se comparan con otros tipos de alimentos se observan valores mayores como en el caso de harina de archicoria (10,9 g/ml) (López y col., 1996), fibra de zanahoria (15,7 ml/g) (Chau y col., 2004a), fibra de calabaza (41,8 ml/g) (Escalada Pla y col., 2007) y fibra de cebolla (19 ml/g RIA) (Benítez, 2011).

Tabla 7.11 – Capacidad de Hinchamiento (CH) (ml/g ms) en leguminosas crudas y procesadas.

Muestra	Judía	Lenteja
Cruda	1,6 ± 0,4 ^a	6,8 ± 0,4 ^c
Cocida	2,5 ± 0,0 ^a	3,3 ± 0,3 ^a
Germinada	7,3 ± 0,6 ^b	4,0 ± 0,0 ^b

Los valores son medias ±DE (n=3). Medias dentro de una columna con diferentes letras son significativamente diferentes a P<0,05.

En relación a las muestras cocidas, los valores de CH aumentan en judía (56%), mientras se reduce en el caso de lenteja (51%). El mismo comportamiento se observa cuando las muestras son germinadas, pero el incremento en judía es de casi cinco veces superior al valor de la muestra cruda, presentando una CH de 7,3 ml/g ms. Sin embargo, la lenteja germinada sufre reducciones de 41%. El distinto comportamiento que muestran las harinas de leguminosas cocidas puede tener origen en la etapa de cocción, donde la homogeneidad del procesamiento en ambas leguminosas no pudo ser alcanzado, debido probablemente a características propias de las semillas, como la distinta composición y permeabilidad de la cubierta de los granos (Waldia y col., 1996). Asimismo, Ahmed y Shehata (1982) y Williams y col. (1983) sugirieron que elevados niveles de la capacidad de hinchamiento, causaba menores tiempos de cocción en garbanzos de las variedades Kabuli y Desi.

Por lo tanto, se puede concluir que las harinas de leguminosas concretamente judía germinada y lenteja cruda son los que presentan mayor capacidad de hinchamiento. En general, se puede decir que las harinas de las leguminosas analizados en este estudio, crudas y procesadas, tienen unas propiedades de hidratación adecuadas, por lo que pueden presentar una serie de efectos fisiológicos beneficiosos como son el aumento del volumen fecal o la reducción de la absorción de nutrientes, así como ciertas características tecnológicas, entre las que se encuentran la reducción de calorías, evitar la sinéresis, además de modificar la viscosidad y la textura del producto final.

7.5 CONCLUSIONES PARCIALES

- ✓ Los procesamientos (cocción y germinación) de judía de Tolosa y lenteja de La Armuña provocan una reducción en la densidad aparente de sus harinas, por tanto mejoran las características tecnofuncionales de estas harinas.
- ✓ La capacidad de retención de aceite en harinas de leguminosas se ve afectada por los procesamientos de cocción y germinación, aumentando notablemente los valores de CRAC. Los análisis estadísticos muestran que existe una relación inversa entre la capacidad de retención de aceite y la densidad aparente.
- ✓ La capacidad de intercambio catiónico disminuye en las muestras sometidas a cocción, mientras que en la germinación apenas se aprecian cambios. Se ha observado que esta propiedad es directamente proporcional con los contenidos de ácidos urónicos y a los valores de densidad aparente.
- ✓ La cocción reduce la capacidad de gelificación, mientras que la germinación mejora esta propiedad. Los resultados indican una relación inversa entre los contenidos de proteína y la capacidad de gelificación. Sin embargo, existe una relación directa entre la CG y el pH, lo que sugiere que esta propiedad podría verse afectada por el equilibrio entre interacciones hidrofóbicas atractivas y interacciones electrostáticas repulsivas.
- ✓ La capacidad emulsionante se modifica de diferente manera según el tipo de leguminosa y método empleado. En general, en judía de Tolosa la capacidad emulsionante se incrementa con el procesamiento, mientras que se observa lo contrario en las muestras de lenteja de La Armuña.
- ✓ Las harinas de leguminosas crudas reúnen mejores características tecnofuncionales en cuanto a la capacidad espumante y estabilidad de la espuma, ya que los tratamientos reducen dichas propiedades en judías y lentejas cocidas y germinadas.
- ✓ La capacidad de absorción de agua en harinas de leguminosa aumenta notablemente con los procesamientos, principalmente en las muestras sometidas a cocción.
- ✓ La capacidad de retención de agua apenas varía entre las muestras de judía cruda, cocida y germinada, mientras que aumenta en las lentejas procesadas.

*" No hay amor más sincero
que el que sentimos hacia la comida."*

George Bernard Shaw

CONCLUSIONES GENERALES



Júlia Pereira Neves

CONCLUSIONES GENERALES

El análisis de los resultados del presente trabajo permite llegar a las siguientes conclusiones:

- ✓ La fibra alimentaria de judía de Tolosa y lenteja de La Armuña está compuesta principalmente por celulosa y polisacáridos pécticos. La cocción provoca un incremento en el contenido de azúcares de la fibra, especialmente debido al aumento en los niveles de glucosa. Este hecho podría deberse a modificaciones en las características del almidón, inducidas por el tratamiento térmico, por lo que consecuentemente quedaría parcialmente incluido en la fracción de fibra alimentaria. Por el contrario, la germinación provoca una notable reducción en el contenido de glucosa, acompañado de un enriquecimiento de la fibra en sustancias pécticas (ácidos urónicos y arabinosa).
- ✓ Por lo que respecta a la fracción de almidón, ambas leguminosas presentan una mayor proporción de almidón en forma disponible que en forma resistente. El procesamiento afecta de diferente manera a la disponibilidad del almidón, destacando un significativo aumento de almidón disponible como consecuencia de la germinación.
- ✓ La pared celular de muestras crudas de judía de Tolosa y lenteja de La Armuña está compuesto principalmente por glucosa, arabinosa y ácidos urónicos. Los procesos tanto de cocción como de germinación afectan significativamente a la composición de carbohidratos de la pared celular. La cocción provoca importantes incrementos en los niveles de glucosa y notables reducciones en los contenidos de arabinosa, mientras que la germinación incrementa el contenido de lignina en ambas leguminosas.
- ✓ El fraccionamiento no degradativo de la pared celular pone de manifiesto que la fracción de CDTA extrae principalmente polisacáridos pécticos, aunque de distinta naturaleza en judía y en lenteja. La cocción y germinación provoca efectos contrapuestos en ambas leguminosas, lo que indica diferencias en la composición de su pared celular, y un efecto distinto de los procesos.
- ✓ La fracción de Na_2CO_3 está formada principalmente por arabinosa, ácidos urónicos y galactosa. En muestras crudas y germinadas de judía se observa la presencia de galacturonanos altamente ramificados con arabinosa y/o arabinanos. Por el contrario, en lenteja cruda y germinada, así como en las muestras cocidas de ambas

leguminosas, el contenido de ácidos urónicos sugiere que los polisacáridos pécticos son menos ramificados, posiblemente del tipo homogalacturonanos.

- ✓ El estudio pormenorizado de los polisacáridos de la pared celular extraídos con KOH revela que las hemicelulosas de las leguminosas procesadas están formadas por xilanos o xiloglucanos no unidos a la matriz celulósica.
- ✓ El residuo final de judía está constituido por un esqueleto de celulosa, encontrándose una importante proporción de sustancias pécticas de tipo homogalacturonanos altamente ramificados con arabinosa, y/o arabinanos. Sin embargo, en lenteja existen también importantes cantidades de polisacáridos hemicelulósicos (arabinosa y xilosa) posiblemente arabinoxilanos íntimamente enlazados al esqueleto de celulosa. Destaca en el proceso de cocción el incremento en el contenido total de carbohidratos en la fracción residual de lenteja, debido a un drástico aumento en los niveles de glucosa y ácidos urónicos.
- ✓ El estudio de los polifenoles y la capacidad antioxidante de judía de Tolosa y lenteja de La Armuña pone de manifiesto bajos contenidos en polifenoles totales, comparado con otras leguminosas. En general el procesamiento térmico disminuye el contenido de polifenoles totales, mientras que la germinación disminuye la capacidad antioxidante en ambos métodos (DPPH y FRAP). Se observa una relación directa entre el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante.
- ✓ En relación con las propiedades hipoglucémicas, todas las muestras estudiadas provocan un retraso en la difusión de glucosa, observándose además que la judía cocida presenta la mayor capacidad de adsorción de glucosa. Asimismo, se aprecia un retardo de la actividad α -amilasa y disminución de la digestibilidad del almidón. Por lo tanto, estas leguminosas podrían estar indicadas como ingredientes en alimentos usados en dietas especiales.
- ✓ La evaluación de las propiedades tecnofuncionales de las harinas de judía y lenteja pone de manifiesto que los procesos de cocción y germinación producen una modificación de las mismas, observándose una mejora de la capacidad de retención de aceite, de absorción de agua y de la densidad aparente, lo que puede repercutir favorablemente en su potencial de utilización como ingrediente alimentario.

BIBLIOGRAFIA



BIBLIOGRAFIA

- AACC. **2001**. American Association of Cereal Chemists. The definition of dietary fiber. Dietary Fiber Technical Committee. Cereal Foods World, 46, 112-126.
- Abdel-Rehim, F.; Abdel-Mobdy, E.; Mohamed-Abdel, O.; Erdmann, V.A.; Lippmann, C. **1995**. The changes of protein patterns during one week of germination of some legume seeds and roots. Food Chem., 52 (4), 433-437.
- Abdul-Hamid, A.; Luan, Y. S. **2000**. Functional properties of dietary fiber prepared from defatted rice bran. Food Chemistry, 68, 15-19.
- Adebowale, K.O.; Lawal, O.S. **2004**. Comparative study of the functional properties of bambarra groundnut (*Voandzeia subterranean*), jack bean (*Canavalia ensiformis*) and mucuna bean (*Mucuna pruriens*) flours. Food Res. Int., 37, 355-365.
- Adrian, J.; Potus, J.; Poiffait, A.; Dauvillier, P. **2000**. Análisis nutricional de los alimentos. Editora Acirbia. 292p.
- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. **2001**. Report apports nutritionnels conseillés pour la population française, France.
- Agizzio, A.P.; Carvalho, A.O.R.; Suzanna de Fátima, F.; Machado, O.L.T.; Alves, E.W.; Okorokov, L.A., Samaraño, S.S. et al. **2003**. Arch. Biochem. Biophys., 416, 188-195.
- Aguilera, Y.G. **2009**. Harinas de leguminosas deshidratadas: caracterización nutricional y valoración de sus propiedades tecno-funcionales. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Química Agrícola. 274p.
- Aguilera, Y.; Dueñas, M.; Estrella, I.; Hernández, T.; Benítez, V.; Esteban, R.M.; Martín-Cabrejas, M.A. **2010**. Evaluation of phenolic profile and antioxidant properties of Pardina lentil as affected by industrial dehydration. J. Agric. Food Chem., 58, 10101-10108.
- Ahmed, M.; Shehata, E.L.T. **1982**. Cooking quality of faba beans. In Faba beans improvement; Hawtin, G., Webb, C., Eds.; International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA): Aleppo, Syria.; 355-362.
- Akpanunam, M.A.; Sefa-Dedeh, S. **1997**. Some physicochemical properties and antinutritional factors of raw, cooked and germinated Jack bean (*Canavalia ensiformis*). Food Chem., 59 (1), 121-125.
- Alasalvar, C., Grigor, J.M., Zhang, D., Quantick, P.C., Shahidi, F. **2001**. Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. J. Agric. Food Chem., 49, 1410-1416.
- Almeida Costa, G.E.; Queiroz-Monici, K.S; Machado Reis, S.M.P.; Oliveira, A.C. **2006**. Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. Food Chem., 94, 327-330.
- Aluko, R.E.; Yada, R.Y. **1995**. Structure-function relationships of cowpea (*Vigna unguiculata*) globulin isolate: influence of pH and NaCl on physicochemical and functional properties. Food Chem., 53, 259-265.
- Amarowicz, R.; Pegg, R.B. **2008**. Legumes as a source of natural antioxidants. Eur. J. Lipid Sc. Technol., 110, 856-878.
- American Dietetic Association. **2008**. Position of the American dietetic association: Health implications of dietary fiber. J. Amer. Diet. Assoc., 108, 1716-1731.
- Amorós, M.L.L. **2000**. Estudios de compuestos fenólicos en legumbres. Influencia de la variedad y del proceso de germinación. Tesis Doctoral Universidad Autónoma de Madrid.
- Anderson, J.W.; Major, A.W. **2002**. Pulses and lipaemia, short- and longterm effect: potential in the prevention of cardiovascular disease. Br J Nutr., 88, 263-271.
- AOAC. **1994**. Official Methods of Analysis, 14th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC.
- AOAC. **1995**. Official Methods of Analysis, 16th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC.
- Arntfield, S.D.; Murray, E.D. **1981**. The influence of processing parameters of food protein functionality I. Differential scanning calorimetry as an indicator of protein denaturation. Canadian Inst. Food Sci. Techn. J., 14, 289-294.

- Asp, N.G. **1996**. Dietary carbohydrates: classification by chemistry and physiology. *Food Chem.* 57, 9-14.
- Atienza, J.; Sanz, M.; Herguedas, A.; Alejos, J.A.; Jimenez, J.J. **1999**. Beta-carotene alpha-tocopherol and gamma-tocopherol contents in dry legumes. Influence of cooking. *Food Sci. Technol. Int.*, 4, 437-441.
- Azcón-Bieto, J.; Talón, M. **2008**. Fundamentos de fisiología vegetal. 2ª Ed. Publicacions i Edicions. Universitat de Barcelona.
- Bach Knudsen, K.E. **2001**. The nutritional significance of "dietary fibre" analysis. *Animal Feed Sc. Technol.*, 90, 3-20.
- Baltes, W. **2007**. Química de los alimentos. Ed. Acirbia, S.A. Zaragoza, España. 476 p.
- Barampama, Z.; Simard, R.E. **1995**. Effects of soaking, cooking and fermentation on composition, in-vitro starch digestibility and nutritive value of common beans. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 48, 349-365.
- Bartolomé, B.; Estrella, I.; Hernandez, T. **1997**. Changes in phenolic compounds in lentils (*Lens culinaris*) during germination and fermentation. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A.*, 205, 290-294.
- Bartolomé, B.; Estrella, I.; Hernández, M.T. **2000**. Interaction of low molecular weight phenolics with proteins (BSA). *J. Food Sci.*, 65, 617-621.
- Bednar, G.E.; Patil, A.R.; Murray, S.M.; Grieshop, C.M.; Merchen, N.R.; Fahey, G.C. **2001**. Starch and fiber fractions in selected food and feed ingredients affect their small intestinal digestibility and fermentability and their large bowel fermentability in vitro in a canine model. *Amer. Soc. Nutr. Sci.* 131, 276-286.
- Bell, E.A. **1981**. Secondary plant products. In *The biochemistry of plants*; Conn, E. E., Eds.; Academic Press, Londres.; Vol 7.
- Belitz, H.D.; Grosh, W. **1997**. Química de los alimentos. 2ª Ed. Editorial Acirbia.
- Bemiller, J.N. **1977**. Starch modification: challenges and prospects. *Starch.*, 49, 127-131.
- Bender, F.E.; Douglass, L.W.; Kramer, A. **1989**. Statistical Methods for Food and Agriculture, Food Products Press, New York.
- Bennett, W.G.; Cerda, J.J. **1996**. Benefits of dietary fiber. *Dietary Fiber*, 99, 153-172.
- Benítez, V.G. **2011**. Caracterización de subproductos de cebolla como fuente de fibra alimentaria y otros compuestos bioactivos. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Química Agrícola. 282p.
- Benzie I.F.F.; Strain J.J. **1996**. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Bioch.*, 239, 70-76.
- Berger, M.; Venhaus, A. **1992**. Dietary fibre in the prevention and treatment of *diabetes mellitus*. In *Dietary Fiber – A component of Food Nutritional Function in Health and Disease*; Schweizer, T. F., C.A., Eds.; Springer-Verlag: London, 181-191.
- Berrios, J.J.; Swanson, B.G.; Cheong, A. **1999**. Physico-chemical characterization of stored black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Research Intern.*, 32, 669-676.
- Berry, C.S. **1986**. Resistant starch: Formation and measurement of starch that survives exhaustive digestion with amylolytic enzymes during determination of dietary fibre. *J. Cereal Sci.* 4, 301-314.
- Betancur-Ancona, D.; Gallegos-Tintoré, S.; Chel-Guerrero, L. **2004**. Wet-fractionation of *Phaseolus lunatus* seeds: partial characterization of starch and protein. *J. Sci. Food Agri.*, 84, 1193-1201.
- Beuchat, L.R. **1977**. Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour protein. *J. Agric. Food Chem.*, 25, 258-261.
- Bingham, S.A.; Day, N.E.; Luben, R.; Ferrari, P.; Slimani, N.; Norat, T.; Clavel-Chapelon, F.; Kesse, E.; Nieters, A.; Boeing, H.; y col. **2003**. Dietary fiber in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* 361, 1496-1501.
- Blumenkrantz, N.; Asboe-Hansen, G. **1973**. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.*, 54, 484-489.
- Bornet, F.R.J.; Billaux, M.S.; Messing, B. **1997**. Glycemic index concept and metabolic diseases. *Int. J. Biol. Marcomol.* 21, 207-219.
- Bornet, F.R.; Jardy-Gennetier, A.E.; Jacquet, N.; Stowell, J. **2007**. Glyceamic response to foods: impact on satiety and long-term weight regulation. *Appetite*, 49, 535-553.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. **1995**. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 22, 25-30.

- Bravo, L.; Abia, R.; Goni, I.; Saura-Calixto, F. **1995**. Possible common properties of dietary fibre constituents and polyphenols. *European Journal of Clinical Nutrition*, 49, 211–214.
- Bravo, L.; Abia, R.; Saura-Calixto, F. **1994**. Polyphenols as dietary fibre associated compounds. Comparative study on in vivo and in vitro properties. *J. Agric. Food Chem.*, 42 (7), 1481-1487.
- Brett, C.; Waldron, K.W. **1990**. Physiology and Biochemistry of plants cell walls. *Topics in Plants Physiology*: 2. London. 194 p.
- Brett, C.; Waldron, K.W. **1996**. Cell wall degradation and biotechnological applications. In *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls*; Black, M., Charlwood, B., Eds.; Chapman and Hall: London, U.K.; 206-221.
- Buckeridge, M.S.; Reid, J.S. **1994**. *Planta*, 192, 502–511.
- CAC, Codex Alimentarius Commission. **2006**. Report of the 27th Session of the Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses, Bonn, Germany 21-25 November 2005. ALINORM 06/29/26, 2006
- Camacho-Espinosa, M.K.; Guevara, L.I.P.; Valenzuela, J.A.L.; Ortiz, A.V.; Perez, R.A.S.; Herrera, C.G.M.; Godoy, S.M. **2010**. Caracterización proteómica de granos de frijol azufrado (*Phaseolus vulgaris*) cultivados en el Estado de Sinaloa. *Ra Ximhai*, enero-abril, 6 (1), 23-36.
- Cardona Velásquez, C. **2004**. La nueva tendencia en nutrición. *Énfasis Alimentación*, 4, 86–90.
- Cervera, P.; Clapes, J.; Rigolfas, R. **1999**. *Alimentación y Dietoterapia*. McGraw-Hill Interamericana, Madrid.
- Champ, M.; Martin, L.; Noah, L.; Gratas, M. **1999**. In *Complex carbohydrates in foods*; Cho, S. S., Prosky, L., Orcher, M., Eds.; New York: Marcel Dekker, 169-187
- Champ, M.M.J. **2002**. Non-nutrient bioactive substance of pulses. *Br. J. Nutr.*, 88, 307-319.
- Chandalia, M.; Garg, A.; Lutjohann, D.; Von Bergmann, K.; Grundy, S.M.; Brinkley, L.J. **2000**. Beneficial effects of high dietary fiber intake in patients with type 2 Diabetes Mellitus. *New Engl. J. Med.*, 342, 1392-1398.
- Chang, M.C.; Morris, W.C. **1990**. Effect of heat treatments on chemical analysis of dietary fiber. *J. Food Sci.*, 55, 1647-1650.
- Chau, C.F.; Cheung, P.C.K. **1998**. Functional properties of flour prepared from three Chinese indigenous legume seeds. *Food Chem.*, 61, 429-433.
- Chau, C.F.; Cheung, P.C.K.; Wong, Y.S. **1997**. Functional properties of protein concentrates from three Chinese indigenous legume seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2500-2503.
- Chau, C.F.; Cheung, P.C.K.; Wong, Y.-S. **1998**. Chemical composition of three underutilized legume seeds grown in China. *Food Chemistry*, 61, 4, 505-509.
- Chau, C.F.; Huang, Y.L.; Lee, M.H. **2003**. In vitro hypoglycemic effects of different insoluble fiber-rich fractions prepared from the peel of *Citrus sinensis* L. cv Liucheng. *J. Agric. Chem.* 51, 6623-6626.
- Chau, C.F.; Chen, C.H.; Lee, M.H. **2004a**. Comparison of the characteristics, functional properties, and in vitro hypoglycemic effects of various carrot insoluble fiber-rich fractions. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 37, 155 – 160.
- Chau, C.F.; Chen, C.H.; Lin, C.Y. **2004b**. Insoluble fiber-rich fractions derived from *Averrhoa carambola*: hypoglycemic effects determined by in vitro methods. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 37, 331 – 335.
- Chau, C.F.; Wang, Y.T.; Wen, Y.L. **2007**. Different micronization methods significantly improve the functionality of carrot insoluble fibre. *Food Chemistry* 100, 1402 – 1408.
- Chau, C.F.; Huang, Y.L. **2003**. Comparison of the chemical composition and physicochemical properties of different fibers prepared from the peel of *Citrus sinensis* L. cv. Liucheng. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2615-2618.
- Chau, C.F.; Huang, Y.L. **2004**. Characterization of passion fruit seed fibres - a potential fibre source. *Food Chem* 85, 189-194.
- Chel-Guerrero, L.; Red-Flores, V.P.; Betancur-Ancona, D.; Vila-Ortiz, G.D. **2002**. Functional properties of flours and protein isolates from *Phaseolus lunatus* and *Cannavalia ensiformis* seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 584-591.
- Cheung, P.C.K.; Chau, C.F. **1998**. Changes in the dietary fiber (resistant starch and nonstarch polysaccharides) content of cooked flours prepared from three Chinese indigenous legumes seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 262-265.
- Chung, H.J.; Q. Liu, Hoover, R.; Warkentin, T.D.; Vandenberg, B. **2008**. In vitro starch digestibility, expected glycemic index, and thermal and pasting properties of flours from pea, lentil and chickpea cultivars. *Food Chem.*, 111, 316-321.

- Clemente, A.; MacKenzie, D.A.; Jonson, I.T.; Domoney, C. **2004**. Investigation of legume seed protease inhibitors as potential anticarcinogenic proteins. In Proceedings of the fourth international workshop on antinutritional factors in legume seeds and oilseeds; Muzquiz, M., Hill, G. D., Cuadrado, C., Pedrosa, M. M., Burbano, C., Eds.; EAA Publications, Wageningen, 137–141.
- Coimbra M.A.; Waldron K.W.; Selvendran R.R. **1995**. Isolation and characterisation of cell wall polymers from the heavily lignified tissues of olive (*Olea europaea*) seed hull. *Carbohydr Polym* 27 285-294.
- Colin-Henrion, M.; Mehinagic, E.; Renard, C.M.G.C.; Richomme, P.; Jourjon, F. **2009**. From apple to applesauce: Processing effects on dietary fibres and cell wall polysaccharides. *Food Chem* 117: 254-260.
- Coultate, T.P. **1986**. Alimentos, Química de sus componentes. Ed. Zaragoza : Acribia. 199 p.
- Croy, R.R.D.; Gatehouse, J.A.; Evans, I.M.; Boulter, D. **1980**. *Planta*, 148, 49–56.
- Cubero, J.I.; Moreno, M.T. **1983**. Leguminosas de grano. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España, 31-47.
- Cummings, J.H.; Macfarlane, G.T. **1991**. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J. Appl. Bacteriol.*, 70, 443–459.
- Dagorn-Scaviner, C.; Gueguen, J.; Lefebvre, J. **1987**. Emulsifying properties of pea globulins as related to their adsorption behaviors. *J. Food Sci.*, 52, 335-341.
- Dahlqvist, A. **1964**. Method for assay of intestinal disaccharides. *Anal. Biochem.*, 7, 18-25.
- Davis, K.R. **1981**. Effect of processing on composition and tetrahymena relative nutritive-value of green and yellow peas, lentils and white pea beans. *Cereal Chem.*, 58, 454-460.
- Department of Health. **1991**. Dietary Reference Values for Food Energy and Nutrients in the United Kingdom. HMSO, London.
- Deshpande, S.; Sathe, S.; Comforth, D.; Salunkhe, D. **1982**. Effects of dehulling on functional properties of dry bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) flours. *Cereal Chem.* 59: 396-401.
- Deshpande, S.S.; Demondaran, S. **1989**. Structure- digestibility relationship of legume 7S proteins. *J. Food Sci.*, 54(1), 108-13.
- Dewanto, V.; Wu, X.; Liu, R. **2002**. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4959–64.
- Dietary Guidelines for Americans, **2005**. U.S. Department of Health and Human Services. U.S. Department of Agriculture. Disponible en: www.healthierus.gov/dietaryguidelines
- Dini, I.; Tenore, G.C.; Dini, A. **2008**. Chemical composition, nutritional value and antioxidant properties of *Allium cepa* L. var. Tropeana (red onion) seeds. *Food Chem* 107, 613–621
- Dini, I.; Tenore, G.C.; Dini, A. **2010**. Antioxidant compound contents and antioxidant activity before and after cooking in sweet and bitter *Chenopodium quinoa* seeds. *Food Sci. Technol.*, 43, 447–451.
- Diwakar, P.; Kushwah, A.M.; Kushwah, H.S. **1996**. Effect of processing on the functional properties of some local varieties of horsegram (*Dolichos biflorus*, L.) in Madhya Pradesh. *J. Food Sci. Technol.*, 33, 150-152.
- Dueñas, M.; Hernández, T.; Estrella, I. **2002**. Phenolic composition of the cotyledon and the seed coat of two varieties of lentils (*Lens culinaris*). *Eur. Food Res. Technol.*, 215, 478-483.
- Dueñas, M.; Sun, B. S.; Hernández, T.; Estrella, I.; Spranger, I. **2003**. Proanthocyanidins composition in the seed coat of lentils (*Lens culinaris* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 51, 7999-8004.
- Dueñas, M.; Hernández, T.; Estrella, I. **2004**. Occurrence of phenolic compounds in the seed coat and the cotyledon of peas (*Pisum sativum* L.). *Eur. Food Res. Technol.*, 219, 116-123.
- Dueñas, M.; Hernández, T.; Estrella, I. **2006**. Assessment in vitro antioxidant capacity of the seed coat and the cotyledon of legumes in relation to their phenolic content. *Food Chem.*, 98, 95-103.
- Dueñas, M.; Hernández, T.; Estrella, I.; Fernández, D. **2009**. Germination as a process to increase the polyphenol content and antioxidant activity of lupin seeds (*Lupinus angustifolius* L.). *Food Chem.*, 117, 599-607.
- Duranti, M. **2006**. Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*. 77, 67-82.
- Duranti, M.; Scarafoni, A.; Di Cataldo, A.; Sessa, F. **2001**. Interaction of metal ions with lupin seed conglutin γ . *Phytochemistry*, 56, 529-533.
- Dust, J.M.; Gajda, A.M.; Flickinger, E.A.; Brukhaltier, T.M.; Merchen, N.R.; Fahey, G.C. **2004**. Extrusion conditions affect chemical composition and in vitro digestion of select food ingredients. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 2989-2996.

Dzudie, T.; Hardy, J. **1996**. Physicochemical and functional properties of flours prepared from common beans and green mung beans. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 3029-3032.

Eastwood, M.A. **1992**. The Physiological Effect of Dietary Fiber: An Update. *Annual Review Nutr.*, 12, 19-35.

Eastwood, M.A.; Morris, E.R. **1992**. Physical properties of dietary fiber that influence physiological function: A model for polymers along the gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.*, 55, 436-442.

Edwards, C.A. **1995**. In *The physiological effects of dietary fibre: dietary fibre in health and disease*; Kristchevsky, D., Bonfield, C., Eds.; St. Paul, MN: Eagan Press, 58-71.

El-Sayed, M.M. **1997**. Use of plant protein isolates in processed cheese. *Nahrung.*, 41, 91-95.

Elleuch, M.; Bedigian, D.; Roiseux, O.; Besbes, S.; Blecker, C. Attia, H. **2011**. Dietary fibre and fibre-rich by products of food processing: Characterisation technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chem.* 124, 411-421.

Escalada-Pla, M.F.; Ponce, N.M.; Stortz, C.A.; Gerschenson, L.N.; Rojas, A.M. **2007**. Composition and functional properties of enriched fiber products obtained from pumpkin (*Curcubita moschata* Duchesne ex Poiré). *LWT* 40, 1176-1185.

Escudero Álvarez, E; González Sánchez, P. **2006**. La fibra dietética. *Nutr Hosp* 21: 61-72.

Esteban, R.M.; Mollá, E.; Valiente, C.; Jaime, L.; López-Andréu, F.-J.; Martín-Cabrejas, M.A. **1998**. Dietary fiber: chemical and physiological aspects. *Rec. Res. Devel. Agric. Food Chem.*, 2, 293-308.

FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. **1999**. El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo. Inseguridad alimentaria: la población se ve obligada a convivir con el hambre, y teme morir de inanición. In: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/x3114s/x3114s00.pdf>

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations/Expert Consultation **2003**. Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. WHO Technical Report Series: 916. Geneva: WHO; 2004.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. **2004**. Carbohydrates in Human Nutrition. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, FAO/WHO, Rome, Italy.

FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. **2005**. Legumbres: tendencias registradas en el pasado y perspectivas para el futuro. Perspectivas alimentarias – sistema mundial de información y alerta sobre la agricultura y alimentación (SMIA). N° 4. In: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/008/j6801s/j6801s00.pdf>

FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. **2010**. El estado mundial de la agricultura y la alimentación – Las mujeres en la agricultura. Cerrar la brecha de género en áreas de desarrollo. In: <http://www.fao.org/publications/sofa/es/>

FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **2011**. <http://faostat.fao.org/>.

Femenia, A.; Lefebvre, A.C.; Thebaudin, J.Y.; Robertson, J.A.; Bourgeois, C.M. **1997**. Physical and sensory properties of model foods supplemented with cauliflower fiber. *J Food Sci* 62: 635-639.

Femenia, A.; García-Pascual, P.; Simal, S.; Roselló, C. **2003**. Effects of heat treatment and dehydration on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from *Aloe barbadensis* Miller. *Carbohydr Polym* 51: 397-405.

Fernández-Orozco, R.; Zielinski, H.; Piskula, M.K. **2003**. Contribution of low-molecular-weight antioxidants to the antioxidant capacity of raw and processed lentil seeds. *Die Nahrung*, 47, 291-299.

Fernández-Orozco, R.; Piskula, M.K.; Zielinski, H.; Kozłowska, H.; Frias, J.; Vidal-Valverde, C. **2006**. Germination as a process to improve the antioxidant capacity of *Lupinus angustifolius* L. var. Zapaton. *European Food Res. Tech.*, 223, 495-502.

Fernández-Orozco, R.; Frias, J.; Zielinski, H.; Piskula, M.K.; Kozłowska H.; Vidal-Valverde, C. **2008**. Kinetic study of the antioxidant compounds and antioxidant capacity during germination of *Vigna radiata* cv. emerald, *Glycine max* cv. Jutro and *Glycine max* cv. Merit. *Food Chem.*, 111, 622-630.

Fernández-Quintela, A.; Larralde, J.; Macarulla, M.T.; Marcos, R.; Martínez, J.A. **1993**. Leguminosas y concentrados de proteína: nuevas perspectivas y aplicaciones. *Alimentaria.*, 1, 59-63.

Figuerola, F.; Hurtado, M.L.; Estévez, A.M.; Chiffelle, I.; Asenjo, F. **2005**. Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potencial fibre sources for food enrichment. *Food Chem* 91: 395-401.

Flourie, B. **1992**. The influence of dietary fiber on carbohydrate digestion and absorption. In *Dietary Fiber-A Component of Food Nutritional Function in Health and Disease*; Schweizer, T. F., Edwards, C. A., Eds.; Springer-Verlag: London; 181-196.

- Franco, C.L.M.; Ciacco, D.F. **1992**. Factors that affect the enzymatic degradation of natural starch granules - effect of the size of the granules. *Starch.*, 44, 422-426.
- Frías, J.; Vidal-Valverde, C.; Sotomayor, C.; Díaz-Pollán, C.; Urbano, G. **2000**. Influence of processing on available carbohydrate content and antinutritional factors of chickpeas. *Eur. Food Res. Technol.*, 210, 340-345.
- Frías, J.; Fernández-Orozco, R.; Zielinski, H.; Piskula, M.; Kozłowska, H.; Vidal-Valverde, C. **2002**. Effect of germination on the content of vitamin C and E of lentils. *Polish J. Food Nutr. Sc.* 11/52:76.
- Friedman, M.; Brandon, D.L. **2001**. Nutritional and health benefits of soy proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1069-1086.
- Fuentes-Zaragoza, E.; Riquelme-Navarrete, M.J.; Sánchez-Zapata, E.; PérezÁlvarez, J.A. **2010**. Resistant starch as functional ingredient: A review. *Food Research International*. doi: 10.1016/j.foodres.2010.02.004.
- Fukui, K.; Tachibana, N.; Wanezaki, S.; Tzuzaki, S.; Takamatsu, K.; Yamamoto, T.; Hashimoto, Y.; Shimoda, T. **2002**. Isoflavone-Free Soy Protein Prepared by Column Chromatography Reduces Plasma Cholesterol in Rats. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5717-5721.
- Furda, I. **1990**. Interaction of dietary fiber with lipids mechanistic theories and their limitations. En: Furda, I.; Brine, C.J. (eds), *New developments in dietary fiber*. New York : Plenum Press, 67-82.
- Garau, M.C.; Simal, S.; Roselló, C.; Femenia, A. **2007**. Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium* v. Canoneta) by-products. *Food Chem* 104: 1014-1024.
- García Peris, P.; Bretón Lesmes, I.; de la Cuerda Compes, C.; Cambor Álvarez, M. **2002**. Metabolismo colónico de la fibra. *Nutr. Hosp.*, 17, 11-16.
- García Peris, P.; Velasco-Gimeno, C. **2007**. Evolución en el conocimiento de la fibra. *Nutr. Hosp.*, 22, 20-25.
- Garleb, K.A.; Bourquin, L.D.; Fahey, G.C. **1989**. Neutral monosaccharide composition of various fibrous substrates: a comparison of hydrolytic procedures and use of anion-exchange high performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection of monosaccharides. *J. Agric. Food Chem.*, 37, 1287-1293.
- Garido, I.; Monagas, M.; Gomez-Cordoves, C.; Bartolome, B. **2007**. Polyphenols and antioxidant properties of almond skins: Influence of industrial processing. *J. Food Sci.*, 78, 106-115.
- Genovese, M.I.; Lajolo, F.M. **1996**. In vitro digestibility of albumin proteins from *Phaseolus vulgaris* L. Effect of chemical modification. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 3022-3028.
- German Nutrition Society/Deutsche Gesellschaft für Ernährung. **2000**. Österreichische Gesellschaft für Ernährung, Schweizerische Vereinigung für Ernährung. Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr (1st edition). Frankfurt am Main: Umschau/Braus.
- Ghavidel, R.A.; Prakash, J. **2007**. The impact of germination and dehulling on nutrients, antinutrients, in vitro iron and calcium bioavailability and in vitro starch and protein digestibility of some legume seeds. *Food Sci. Techn.* 40, 1292-1299.
- Giami, S.Y.; Okwechime, U.I. **1993**. Physiochemical properties and cooking quality of four new cultivars of Nigerian cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *J. Sci. Food Agr.*, 63, 281-286.
- Gibson, G.R. **2004**. Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). *Clin Nutr*; 23(Supl. 2).
- Gopalan, 1981; Gupys, 1982; Mosse y Bandet, 1983
- Gooneratne, J.; Majsak-Newman, G.; Robertson, J.A.; Selvendran, R.R. **1994**. Investigation of factors that affect the solubility of dietary fiber, as nonstarch polysaccharides, in seed tissues of mung bean (*Vigna radiata*) and black gram (*Vigna mungo*). *J. Agric. Food Chem.*, 42, 605-611.
- Gordon, D.T.; Okuma, K. **2002**. Determination of total dietary fiber in selected foods containing resistant maltodextrin by enzymatic-gravimetric method and liquid chromatography: Collaborative study. *J. AOAC Intern.*, 85, 435-444.
- Gourgue, C.M.P.; Champ, M.M.J.; Lozano, Y.; Delort-Laval, J. **1992**. Dietary fiber from mango byproducts: characterization and hypoglycemic effects determined by in vitro methods. *J. Agric. Food Chem.* 40, 1864-1868.
- Granito, M.; Brito, Y.; Torres, A. **2007**. Chemical composition, antioxidant capacity and functionality of raw and processed *Phaseolus lunatus*. *J. Sci. Food Agric*, 87, 2801-2809.
- Gray, J. **2006**. Dietary fibre. Definition, analysis, physiology and health. ILSI Europe Concise Monograph Series. Brussels: ILSI.

- Grigelmo-Miguel, N.; Martín-Belloso, O. **1999**. Characterization of dietary fiber from orange juice extraction. *Food Res Int* 31 (5): 355-361.
- Guéguen, J.; Cerletti, P. **1994**. Proteins of some legume seeds, soybean, pea, faba bean and lupin. En: Hudson BJF, editor. *New and developing sources of food proteins*. New York: Chapman and Hall; 145 p.
- Guillon, F.; Champ, M.M.J. **2000**. Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology. *Food Research Int* 33: 233-245.
- Guillon, F.; Champ, M.; Thibault, J.F. **2000**. Dietary fibre functional products. En: GR Gibson y CM Williams (eds.). *Functional Foods*. Woodhead Publishing, Cambridge, England, 315-355.
- Guillon, F.; Champ, M.M.J. **2002**. Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health. *Br. J. Nutr.*, 88, 293-306.
- Gurr, M.I.; Asp, N.-G. **1996**. Dietary fibre. International Life Sciences Institute. ILSI Europe.
- Hajós, G.; Gelencsér, E.; Grant, G.; Bardocz, S.; Sakhrí, M.; Duguid, T.J.; Newman, A. M.; Pusztai, A. **1996**. Effect of proteolytic modification and methionine enrichment on the nutritional value of soya albumins for rats. *J. Nutr. Biochem.*, 7, 481-487.
- Han, J.; Jann, J.A.M.; Gerlat, M. **2010**. Development of gluten-free cracker snacks using pulse flours and fractions. *Food Reserch. Int.*, 43, 627-633.
- Hawkins, A.; Johnson, S.K. **2005**. In vitro carbohydrate digestibility of whole-chickpea and chickpea bread products. *Int J Food Sci Nutr.*, 56, 147-55.
- Health Council of the Netherlands. **2006**. Guideline for dietary fibre intake. The Hague, 2006: publication no. 2006/03E, 2006
- Henn, R.L.; Netto, F.M. **1998**. Biochemical characterization and enzymatic hydrolysis of different commercial soybean protein isolates. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 3009-3015.
- Herken, E.N.; Ibanoglu, S. Oner, M.D.; Bilgiçli, N.; Guzel. **2007**. Effect of storage on the phytic acid content, total antioxidante capacity and organoleptic properties of macaroni enriched with cowpea flour. *J. Food Engin.* 78, 366-372.
- Hipsley, E.H. **1953**. Dietary fibre and pregnancy toxemia. *Britt. Med. J.*, 2, 636-639
- Hsieh, H.M.; Pomeranz, Y.; Swanson, B.G. **1992**. Composition, cooking time and maturation of azuki (*Vigna angularis*) and common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Cereal Chem.*, 69, 244-248.
- Holt, S.; Muntyan, I.; Likyer, L. **1996**. Soya-based diets for Diabetes Mellitus. *Alternative & Complementary Therapies*, March/April 1996.
- Holt, S.H.A.; Brand-Miller, J.C.; Stitt, P.A. **2001**. The effects of equal-energy protions of different breads on blood glucose levels, feelings of fullness and subsequent food intake. *J. Am. Diet. Assoc.*, 101, 767-773.
- Hoover, R.; Zhou, Y. **2003**. In vitro and in vivo hydrolysis of legume starches by alfa-amylase and resistant starch formation in legumes-a review. *Carbohydr. Polym.*, 54, 401-417.
- Hsu, D.; Leung, H.; Morad, M.; Finney, P.; Leung, C. **1982**. Effect of germination on electroforetc, funcional, and breadbaking properties of yellow pea, lentil, and faba bean protein isolates. *Cereal Chem.* 59: 344-350.
- Huang, D. ; Ou, B. ; Prior, R. **2005**. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1841-1856.
- Huisman, M.M.H.; Schols, H.A.; Voragen, A.G.J. **1996**. Isolation and sequential extraction of cell wall polysaccharides from soy meal. *Carbohydrate Polymers*, 37, 87-95.
- Huisman, M.M.H.; Schols, H.A.; Voragen, A.G.J. **1998**. Cell wall polysaccharides from soybean (Glycine max) meal. Isolation and characterisation. *Carbohydrate Polymers*, 37, 87-95.
- Huisman, M.M.H.; Schols, H.A.; Voragen, A.G.J. **1999**. Enzymatic degradation of cell wall polysaccharides from soybean meal. *Carbohydrate Polymers*, 38, 299-307.
- Hughes, J.S. **1991**. Potential contribution of dry bean dietary fiber to health. *Food Technol.*, 9, 122-126.
- Hulton, C.W.; Campbell, A.M. **1981**. Water and fat absorption. In *Protein functionality in foods*; Cherry, J. P., Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 177-200.
- Iawabuchi, S.; Watanabe H.; Yamauchi, F. **1991**. Observation on the dissociation of β -conglycinin into subunits by heat treatment. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 34-40.
- Institute of Medicine. **2002**. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. Washington DC: National Academy Press.

- Inyang, U.; Nwadiukpa, C. **1992**. Functional properties of dehulled sesame (*Sesamum indicum* L.) seed flour. *JOACS* 69, 819-822.
- Iqbal, A.; Khalil, I.; Ateeq, N.; Khan, M.S. **2006**. Nutritional quality of important food legumes. *Food Chemistry* 97,331-335.
- Ismond, M.A.H.; Murray, E.D.; Arntfield, S.D. **1986**. The role of non-covalent forces in micelle formation by vicilin from *Vicia faba*. II. The effect of stabilizing and destabilizing anions on protein interactions. *Food Chem.*, 21, 27-46.
- Jaime, L. **2000**. Análisis de carbohidratos en bulbos de cebolla (*Allium cepa* L.) Aprovechamiento como fuente de fibra alimentaria. Tesis Doctoral. Departamento de Química Agrícola, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España
- Jaime, L.; Mollá, E.; Fernández, A.; Martín-Cabrejas, M.A.; López-Andréu, F.J.; Esteban, R.M. **2002**. Structural carbohydrate differences and potencial source of dietary fiber of onion (*Allium cepa* L.) tissues. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 122-128.
- Jarvi, A.E.; Karlström, B.E.; Grandfeldt, Y.E.; Björck, I.E.; Asp, N.G.L.; Vessby, B.O.H. **1999**. Improved glycemic control and lipid profile and normalized fibrinolytic activity on a low-glycemic index diet in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 22: 10-18.
- Jenkins, D.J.A.; Kendall, C.W.C.; Ransom, T.P.P. **1998**. Dietary fiber, the evolution of the human diet and coronary heart disease. *Nutr. Res.*, 18, 633-652.
- Jenkins, D.J.A.; Wolever, T.M.S.; Taylor, R.; Baker, H.M.; Fielder, H.; Baldwin, J.M.; Bowling, A.C.; Newman, H.C.; Jenkins, A.L.; Goff, D.V. **1981**. Glycemic index of foods: A physiological basis for carbohydrate exchange. *Am. J. Clin. Nutr.*, 34, 362-366.
- Jezierny, D.; Mosenthin, R.; Bauer, E. **2010**. The use of grain legumes as a protein source in pig nutrition. *Animal Feed Sci.Technol.*, 157 (10): 111-128.
- Jiménez, A.; Rodríguez, R.; Fernández-Caro, I.; Guillén, R.; Fernández-Bolaños, J.; Heredia, A. **2000**. Dietary fiber content of table olives processed under different European styles: study of physico-chemical characteristics. *J Sci Food Agric* 80: 1903-1908
- Jood, S.; Bishnoi, S.; Sharma, A. **1998**. Chemical analysis and physico-chemical properties of chickpea and lentil cultivars. *Food Nahrung*, 42, 71-74.
- Kawale, S.; Kadam, S.S.; Chavan, U.D.; Chavan, J.K. **2005**. Effect of processing on insoluble dietary fiber and resistant starch in kidney bean and horse gram. *J. Food Sci. Tech.*, 42, 361-362.
- Kin, Y-I. **2000**. Impact of dietary fiber on colon cancer occurrence. *Aga technical review. Gastroenterology*; 118:1235-1257.
- Kinsella, J.E. **1976**. Functional properties of proteins in foods: a survey. *CRC Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, 7, 219-280.
- Kinsella, J. **1979**. Functional properties of soy proteins, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56: 242-258.
- Koch, J.L.; Horbowicz, M.; Obendorf, R.L. **1999**. Methanol, pectin and pectinesterase changes during soybean seed maturation. *Seed Sci. Res.* (1999) 9, 311-320.
- Kochhar, N.; Walker, A.F.; Pike, D.J. **1988**. Effect of variety on protein content, amino acid composition and trypsin inhibitor activity of cowpeas. *Food Chem.*, 29, 65-78.
- Kutos, T.; Golob, T.; Kac, M.; Plestenjak, A. **2003**. Dietary fibre content of dry and processed beans. *Food Chem.*, 80, 231-235.
- Laemmli, U.K. **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680-685.
- Lallés, J.P.; Peltre, E. **1996**. Biochemical features of grain legume allergens in humans and animals. *Nutr. Rev.*, 54, 101-107.
- Larrauri, J.A. **1999**. New approaches in the preparation of high dietary fibre powders from fruit by-products. *Trends Food Sci. Tech.* 10, 3-8.
- Le Goff, A.; Renard, C.M.G.C.; Bonnin, E.; Thibault, J.F. **2001**. Extraction, purification and chemical characterisation of xylgalacturonans from pea hulls. *Carbohydrate Polymers*, 45, 325-334.
- Lee, S.C.; Prosky, L.; De Vries, J.W. **1992**. Determination of total, soluble, and insoluble dietary fiber in foods — Enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer: Collaborative study. *J. AOAC.*, 75, 395-416.
- Leterme, P. **2002**. Recommendations by health organizations for pulse consumption. *Br J Nutr.*, 3, 239-242.

- Li, B.W.; Schuhmann, P.J.; Wolf, W.R. **1985**. Chromatographic determinations of sugars and starch in a diet composite reference material. *J. Agric. Food Chem.*, 33, 531-536.
- Li, B.W.; Andrews, K.W.; Pehrsson, P.R. **2002**. Individual sugars, soluble, and insoluble dietary fiber contents of 70 high consumption foods. *J. Food Comp. Anal.*, 15, 715-723.
- Liener, I. E. **1994**. Implications of antinutritional components in soybean foods. *C. R. Food Sci. Nutr.*, 34, 31-67.
- Liljeberg, H.G.M.; Granfeldt, W.E.; Björck, M.E. **1996**. Products based on a high fiber barley genotype, but not on common barley or oats, lower postprandial glucose and insulin response in healthy man. *J. Nutr.* 126, 458-461.
- Lin, P.; Lai, H. **2006**. Bioactive compounds in legumes and their germinated products. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 3807-3814.
- Lineback, D.R. **1999**. The chemistry of complex carbohydrates. En: Sungsoo Cho S, Prosky L, Mark Dreher (eds), *Complex Carbohydrates in Foods*. New York Marcel Dekker, Inc.
- Liu, Y.; Ahmad, H.; Luo, Y.; Gardiner, D.T.; Gunasekera, R.S.; Mckeehan, W.L.; Patil, B.S. **2001**. Citrus pectin: Characterization and inhibitory effect on fibroblast growth factor-receptor interaction. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49, 3051-3057.
- López, G.; Ros, G.; Rincón, F.; Periago, M.J.; Martínez, M.C.; Ortuño, J. **1996**. Relationship between physical and hydration properties of soluble and insoluble fiber of artichoke. *J. Agric. Food Chem.* 44, 2773-2778.
- López-Amorós, M.L.; Estrella, I.; Hernández, T. **1998**. Occurrence of low weight phenolic compounds in different varieties of peas (*Pisum sativum* L.) from different origins. 3rd European Conference on Grain Legumes, 305-308.
- López-Amorós, M.L. **2000**. Estudio de compuestos fenólicos en legumbres. Influencia de la variedad y del proceso de germinación. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid.
- López-Amorós, M.L.; Hernández, T.; Estrella, I. **2001**. The germination process. In Relation to the nutritional value of legumes. E: COST Action 916. Bioactive compounds in plant foods- Health effects and perspectives for the food industry. Amadó, R., Abt, B., Bravo, L., Goñi, I., Saura-Calixto, F., Eds.; European Scientific Conference: Tenerife, España, 175-176.
- López-Amorós, M.L., Hernández, T., Estrella, I. **2006**. Effect of germination on legume phenolic compounds and their antioxidant activity. *J. Food Comp. Anal.*, 19, 277-283.
- López-Amorós, M.L.; Lomas, I.; Estrella, I.; Hernández, T. **1998**. Significance of the phenolic composition of different legume seeds on their nutritional and antioxidant properties. In *Effects of Antinutrients on the Nutritional Value of Legume Diets*; Carnovle, E., Ed.; European Communities: Luxembourg, 7, 129-132.
- Mahadevamma, S.; Tharanathan, R.N. **2004**. Processing of legumes: resistant starch and dietary fiber contents. *J. Food Quality* 27, 289-303.
- Mätkki, Y. **2001**. Physical properties of dietary fiber as keys to physiological functions. *Cereal Foods World*, 46, 196-199.
- Mann, J.I.; Cummings, J.H. **2009**. Possible implications for health of the different definitions of dietary fibre. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 19, 226-229.
- Manzocco, L.; Calligaris, S.; Nicoli, M.C. **2002**. Assessment of pro-oxidant activity of foods by kinetic analysis of crocin bleaching. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2767-2771.
- Marconi, E.; Ruggeri, S.; Cappelloni, M.; Leonardi, D.; Carnovale, E. **2000**. Physicochemical, nutritional, and microstructural characteristics of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) following microwave cooking. *J. Agric. Food Chem.* 48, 5986-5994.
- Marlett, J.A.; Vollendorf, N.W. **1993**. Dietary fiber content and composition of vegetables determined by two methods of analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1608-1612.
- Marín-Cabrejas, M.A. **1993**. Evaluación de metodologías en el análisis de fibra alimentaria estudio de la pared celular vegetal. Tesis Doctoral. Departamento de Química Agrícola. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid.
- Marín-Cabrejas, M.A., Waldron, K., Selvendran, R.R. **1994**. Cell walls in Spanish pear during ripening. *J. Plant Physiology*, 91, 671-679.
- Marín-Cabrejas, M.A.; Esteban, R.M.; Perez, P.; Maina, G.; Waldron, K.W. **1997**. Changes in physicochemical properties of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) during long-term storage. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3223-3227.
- Marín-Cabrejas, M.A.; Jaime, L.; Karanja, C.; Downie, A.J.; Parker, M.L.; López-Andréu, F.J.; Maina, G.; Esteban, R.M.; Smith, A.C.; Waldron, K.W. **1999**. Modifications to physicochemical and nutritional properties of hard-to-cook beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by extrusion cooking. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1174-1182.

- Martín-Cabrejas, M.A.; Ariza, N.; Esteban, R.; Mollá, E.; Waldron, K.; López-Andréu, F.J. **2003**. Effect of germination on the carbohydrate composition of the dietary fiber of peas (*Pisum sativum*, L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (5) 1254-1259.
- Martín-Cabrejas, M.A.; Sanfiz, B.; Vidal, A.; Mollá, E.; Esteban, R.; López-Andréu, F.J. **2004**. Effect of fermentation and autoclaving on dietary fiber fractions and antinutritional factors of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 52, 261-266.
- Martín-Cabrejas, M.A.; Aguilera, Y.; Benítez, V.; Mollá, E.; López-Andréu, F.J.; Esteban, R.M. **2006**. Effect of industrial dehydration on the soluble carbohydrates and dietary fibre fractions in legumes. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 7652-7657.
- Martín-Cabrejas, M.A.; Díaz, M.A.; Aguilera, Y.; Benítez, V.; Mollá, E.; Esteban, R.M. **2008**. Influence of germination on the soluble carbohydrates and dietary fibre fractions in non-conventional legumes. *Food Chem.*, 107, 1045-1052.
- Martín-Cabrejas, M.A.; Aguilera, Y.; Pedrosa, M.M.; Cuadrado, C.; Hernández, T.; Díaz, S.; Esteban, R.M. **2009**. The impact of dehydration process on antinutrients and protein digestibility of some legume flours. *Food Chem.*, 114, 1063-1068.
- Martínez-Villaluenga, C.; Kuo, Y.; Lambiein, F.; Frías, J.; Vidal-Valverde, C. **2006**. *European Food Research and Technology*, 224, 177-186.
- Martínez-Villaluenga, C.; Zielinski, H.; Frías, J.; Piskula, M.K.; Kozłowska, H.; Vidal-Valverde, C. **2009**. Antioxidant capacity and polyphenolic content of high-protein lupin products. *Food Chem.*, 112, 84-88.
- Mataix Verdú, J.; Gassull, M.A. **2002**. Fibra alimentaria. En : J Mataix Verdú (ed). *Nutrición y alimentación humana*. Ergon, Madrid, 119-135.
- Mateos-Aparicio, I. **2008**. Aprovechamiento de subproductos de leguminosas para la obtención de ingredientes funcionales. Comparación de metodologías para la caracterización de la fibra alimentaria. Tesis Doctoral. Departamento de Nutrición y Bromatología II: Bromatología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Mateos-Aparicio, I.; Redondo-Cuenca, A.; Villanueva-Suárez, M.J. **2010**. Isolation and characterisation of cell wall polysaccharides from legume by-products: Okara (soymilk residue, pea pod and broad bean pod). *Food Chemistry* 122 339-345.
- Mazu, W.M.; Duke, J.A.; Wahala, K.; Rasku, S.; Adlercreutz, H. **1998**. Isoflavonoids and lignan in legumes: nutritional and health aspects in humans. *J. Nutr. Biochem.*, 9, 193-200.
- McCance, R.A.; Windson, E.M. **1992**. The composition of food 5th. In *Royal Society of Chemistry and Ministry of Agriculture; Fish. Food*, 240-253.
- McCleary, B.V.; Monaghan, D.A. **2002**. Measurement of resistant starch. *J. AOAC Intern.*, 85, 665-675.
- McCleary, B.V.; Jonathan, W.; De Vries, J.W.; Rader, J.I.; Cohen, G.; Prosky, L.; y col. **2010**. Determination of total dietary fiber (CODEX definition) by enzymatic gravimetric method and liquid chromatography: Collaborative study. *J. AOAC Intern.*, 93, 221-233.
- McWatters, K.H.; Cherry, J.P. **1977**. Emulsification, foaming and protein solubility properties of defatted soybean, peanut, field pea and pecan flours. *J. Food Sci.*, 42 (6), 1444-1447.
- McWatters, K.H.; Holmes, M.R. **1979**. Influence of moist heat on solubility and emulsification properties of soy and peanut flours. *J. Food Sci.*, 44 (3), 774-776.
- McWatters, K.H. **1983**. Physical and sensory characteristics of Akara processed from cowpea paste and Nigerian cowpea flour. *Cereal Chem.*, 60, 333-336.
- MERCASA. **2009**. Alimentación en España. Legumbres. Disponible en: http://www.munimerca.es/mercasa/alimentacion_2009/index2.html
- Mohamed-Abdel, O.; Erdmann, V.A.; Lippmann, C.; Abdel-Rehim, F.; Abdel-Mobdy, E. **1995**. Effect of germination on the ribonucleic acids (RNA) of some legume seeds (*Vicia faba*, *Cicer arietinum* and *Lupinus termis*). *Food Chem.*, 52 (4), 427-432.
- Montoya, C.A.; Leterme, P.; Victoria N.F.; Toro O.; Souffrant, W.B.; Beebe, S.; Lallès J.P. **2008**. Susceptibility of phaseolin to in vitro proteolysis is highly variable across common bean varieties (*Phaseolus vulgaris*). *J. Agric. Food Chem.*, 56(6), 2183-2191.
- Moron, D.; Melito, C.; Tovar, J. **1989**. Effect of indigestible residue from foodstuffs on trypsin and pancreatic amylase activity in vitro. *J. Sci. Food Agric.* 47, 171-179.
- Muri, M. A.; Luffs, J. B.; Lo-Sometz, H. **2004**. Patent 2004/CN1498659.
- Mussatto, S.I.; Mancilha, I.M. **2007**. Non-digestible oligosaccharides: A review *Carbohydr. Polym.*, 68, 587-597.

Mwasaru, M.; Muhammad, K.; Bakar, J.; CheMan, Y. **1999**. Effects of isolation technique and conditions on the extractability physicochemical and functional properties of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata*) protein isolates. II. Functional properties. Food Chem., 67, 445-452.

Narahana, K.; Narasinga-Rao, M.S. **1982**. Functional properties of raw and heat processed winged bean flour. J. Food Sci., 47, 1534-1540.

Negi, A.; Boora, P.; Khetarpaul, N. **2001**. Starch and protein digestibility of newly released moth bean cultivars: Effects of soaking, dehulling, germination and pressure cooking. Food Nahrung, 45 (4), 251-254.

Ng, A.; Waldron, K.W. **1997**. Effect of cooking and pre-cooking on cell-wall chemistry in relation to firmness of carrot tissues. J. Sc. Food Agric., 73, 503-512.

Ng, A.; Smith, A.C.; Waldron, K.W. **1998**. Effects of tissue type and variety on cell wall chemistry of onion (*Allium cepa* L.). Food Chem., 63 (1), 17-24.

NHANES - Analytic and Reporting Guidelines. The National Health and Nutrition Examination Survey. Hyattsville, MD: National Center for Disease Statistics, Centers for Disease Control and Prevention; December 2005.

Nishimune, T.; Yakushiji, T.; Sumimoto, T.; Taguchi, S.; Konishi, Y.; Nakahara, S.; Ichikawa, T.; Kunita, N. **1991**. Glycemic response and fiber content of some foods. Am. J. Clin. Nutr. 54, 414-419.

Njintang, Y.N.; Parker, M.L.; Moates, G.K.; Mbofung, C.M.F.; Smith, A.C.; Waldron, K.W. **2006**. Rheology and microstructure of achu, a food based on taro (*Colocasia esculenta* L. Schott), as affected by method of preparation. J. Sci. Food Agric. 2006, 86, 902-907.

Nordic Nutrition Recommendations. **2004**. Integrating nutrition and physical activity. Nord 2004:013, ISBN 92-893-1062-6.

Novaro, P.; D'Egidio, M.G.; Mariani, B.M.; Nardi, S. **1993**. Combined effect of protein content and high temperature drying systems on pasta cooking quality. Cereal Chemistry, 70, 716-719.

Nyman, M.G.L.; Svanberg, S.J.M.; Asp, N.-G.L. **1994**. Molecular weight distribution and viscosity of water-soluble dietary fiber isolated from green beans, brussels sprouts and green peas following different types of processing. J. Sci. Food Agric., 66, 83-91.

Olmedilla-Alonso, B.; Rovilla, R.F.; Vegas, C.A.; Pedrosa, M.M. **2010**. Papel de las leguminosas en la alimentación actual. Activ. Dietética, 14 (2), 72-76.

Oneda, H.; Seunglae, L.; Inouye, K. **2004**. Inhibitory effect of alpha-amylase inhibitor from wheat kernel on the activity of porcine pancreas -amylase and its thermal stability. J. Biochem., 135, 421-427.

Osborn, T.C.; Brown, J.W.S. **1988**. Genetic control of bean seed protein. Critical Reviews in Plant Science. 7(1), 93-116.

Oshodi, A.A.; Adeladun, M.O.A. **1993**. Proximate composition, some nutritional valuable minerals and functional properties of three varieties of lima bean (*Phaseolus lunatus* Linn.) flour. Inter. J. Food Sc. Nutr., 43, 181-185.

Osman, M.A. **2007**. Changes in nutrient composition, trypsin inhibitor, phytate, tannins and protein digestibility of dolichos Lablab seeds (*Lablab purpureus* (L) Sweet) occurring during germination. Journal of Food Technology, 5 (4): 294-299.

Osorio-Díaz, P.; Bello-Pérez, L.A.; Sayazo-Ayerdi, S.G.; Benítez-Reyes, M.D.P.; Tovar, J.; Paredes-Lopez, O. **2003**. Effect of processing and storage time on in vitro digestibility and resistant starch content of two bean varieties. J. Sci. Food Agric., 83, 1283-1288.

Ou, S.; Kwok, K-C.; Li, Y.; Fu, L. **2001**. In Vitro Study of Possible Role of Dietary Fiber in Lowering Postprandial Serum Glucose. J. Agric. Food Chem. 49, 1026-1029.

Padmashree, T.S.; Vijayalakshmi, L.; Puttaraja, S. **1987**. Effect of traditional processing on the functional properties of cowpea flour. J. Food Sci. Technol., 24, 221-225.

Paredes-López, O.; Ordorica-Falomir, C.; Olivares-Vazquez, M.R. **1991**. Chickpea protein isolates: physicochemical, functional and nutritional characteristics. J. Food Sci., 56, 726-729.

Patane, C.; Lacoponi, E.; Raccuia, S.A. **2004**. Physico-chemical characteristics, water absorption, soaking and cooking properties of some Sicilian populations of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Int. J. Food Sci. Nutr., 55, 547-554.

Pearson, D. **1975**. Sugar and preserves. En The Chemical Analysis of Food; Livingstone, C., Eds. Elsevier: London, 107-115.

- Pérez-Gordo, M. **2010**. Estudio proteómico de la alergia a pescado en España: caracterización de alérgenos a nivel epitópico y molecular. Tesis Doctoral. Departamento de Química Agrícola, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid.
- Pérez-Hidalgo, M.A.; Guerra-Hernández, E.; García-Villanova, B. **1997**. Dietary fiber in three raw legumes and processing effect on chickpeas by enzymatic-gravimetric method. *J. Food Comp. Anal.*, 10, 66-72.
- Periago, M.J.; Englyst, H.N.; Hudson, G.J. **1996**. The influence of thermal processing on the non-starch polysaccharide content and in vitro digestibility of starch in peas (*Pisum sativum*, L.). *Lebensm. Wiss. Technol.*, 29, 33-40.
- Phirke, A.V.; Chavan, J.K.; Jadhar, S.J.; Salunkhe, D.K. **1982**. Physical properties, chemical composition, cookability and solubilisation of proteins of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Legume Res.*, 5, 91-96.
- Priestley, D.A. **1986**. Morphological, structural, and biochemical changes associated with seed aging. In D.A. Priestley, Seed aging: implications for seed storage and persistence in the soil. Ithaca, New York: Comstock Publishing Associates. 125.
- Prinyawiwatkul, W.; Beuchat, L.R.; McWatters, K.H. Phillips, R.D. **1997**. Functional properties of cowpea (*Vigna unguiculata*) flour as affected by soaking, boiling, and fungal fermentation. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 480-486.
- Prodanov, M.; Sierra, I.; Vidal-Valverde, C. **1998**. Effect of the germination on the thiamine, riboflavin and niacin contents in legumes. *Food Res. Tech.*, 205, 48-52.
- Prosky, L.; Asp, N.G.; Furda, I.; y col. **1985**. Determination of total dietary fiber in foods and food products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Intern.*, 68, 677-679.
- Prosky, L.; Asp, G.N.; Scheweizer, T.F.; de Vries, J.W.; Furda, I. **1992**. Determination of insoluble and soluble dietary fiber in foods and food products: collaborative study. *J. Assoc. Analyt. Chem. Intern.*, 75, 360-367.
- Przybylski, R.; Lee, Y.C.; Eskin, N.A. **1998**. Antioxidant and radical scavenging activities of buckwheat seed components. *J. Amer. Oil Chem. Society*, 75, 1595-1601.
- Pujolá, M.; Farreras, A.; Casañas, F. **2007**. Protein and starch content of raw, soaked and cooked beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem.*, 102, 1034-1041.
- Rabilloud, T. **2000**. Proteome Research: Two-dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods, Principles and Practice, Springer, Berlin Heidelberg, Germany.
- Ramakrishna, V.; Jhansi Rani, P.; Rao, P.R. **2006**. Anti-Nutritional factors during germination in Indian Bean (*Dolichos lablab* L.) seeds. *World J. Dairy Food Sci.*, 1, 06-11.
- Rangel, A.; Domont, G.B.; Pedrosa, C.; Ferreira, S.T. **2003**. Functional properties of purified vicilins from cowpea (*Vigna unguiculata*) and pea (*Pisum sativum*), and cowpea protein isolate. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 5792-5797.
- Rao, P. U.; Deosthale, Y.G. **1987**. Polyphenoloxidase activity in germinated seeds. *J. Food Sci.*, 52, 1549-1551.
- Ratnayake, W.S., Hoover, R., Shahid, F., Perera, C., Jane, J. **2001**. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of starches from four field peas (*Pisum sativum* L.) cultivars. *Food Chem.*, 74, 189-202.
- Raven, P.; Evert, R.F.; Eichhorn, S.E. **1991**. *Biología de las Plantas*, vol 2. Ed. Reverté, S.A.
- Ravet, K.; Touraine, B.; Boucherez, J.; Briat, J.F.; Gaymard, F.; Cellier, F. **2009**. *Plant J.*, 57, 400-412.
- Redgwell, R.J.; Selvendran, R.R. 1986. Structural features of cellwall polysaccharides of onion *Allium cepa*. *Carbohydrate Research*, 157, 183-199
- Redondo-Cuenca, A.; Villanueva-Suárez, M.J.; Rodríguez-Sevilla, M.D.; Mateos-Aparicio, I. **2006**. Chemical composition and dietary fibre of yellow and green commercial soybeans (*Glycine max*). *Food Chemistry* 101, 1216-1222.
- Rege, D.V. **1981**. Nutritional aspects of legumes: Some research needs. In Proceedings of the Workshop on Grain Legumes (A.S. Aiyer and K.R. Iyer, eds.). Protein Foods and Nutrition Development Association of India, Bombay. 123-132.
- Rehinan, Z.; Rashid, M.; Shah, W.H. **2004**. Insoluble dietary components of food legumes as affected by soaking and cooking processes. *Food Chem.*, 85, 245-249.
- Rehman, S.; Paterson, A.; Hussain, S.; Murtaza, M.A.; Mehmood, S. **2007**. Influence of partial substitution of wheat flour with vetch (*Lathyrus sativus* L.) flour on quality characteristics of doughnuts. *Food Sci. Tech.*, 40, 73-82.

- Reichert, R.D. **1981**. Quantitative isolation and estimation of cell wall material from dehulled pea (*Pisum sativum*) flours and concentrates. *Cereal Chem.*, 58(4), 266-270
- Renard, C.M.G.C.; Weightman, R.M.; Thibault, J.F. **1997**. The xylose-rich pectins from pea hulls. *International Journal of Biological Macromolecules*, 21, 155-162.
- Resmini, P.; Pagani, M.A. **1983**. Ultrastructure studies of pasta. A review. *Food Microstructure*, 2, 12.
- Ring, S.G.; Gee, J.M.; Whittam, M.; Orford, P.; Johnson, I.T. **1988**. Resistant starch: its chemical form in foodstuffs and effect on digestibility in vitro. *Food Chem.*, 28, 97-109.
- Rizkalla, S.W.; Bellisle, F.; Slama, G. **2002**. Health benefits of low glycaemic index foods, such as pulses, in diabetic patients and healthy individuals. *Br J Nutr.*, 88 (3), 255-262.
- Rosamond, W.D. **2002**. Dietary fiber and prevention of cardiovascular disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 39, 57-59.
- Robertson, G.L.; Monredon, F.D.; Dyssele, P.; Guillon, F.; Amado, R.; Thibault, J-F. **2000**. Hydration properties of dietary fibre and resistant starch: a European collaborative study. *Lebensm.-Wiss. u.- Technol.*, 33, 72-79.
- Rubio, L.A.; Rodríguez, J.; Fernández, C.; Crespo, J.F. **2004**. Storage proteins: physiological and antigenic effects. EAAP publication n° 110: Toledo, Spain. 159-175.
- Ryden, P.; Selvendran, R.R. **1990a**. Cell-wall polysaccharides and glycoprotein of parenchymatous tissues of runner bean (*Phaseolus coccineus*). *Biochem. J.*, 269, 393-402.
- Ryden, P.; Selvendran, R.R. **1990b**. Structural features of cell-wall polysaccharides of potato (*Solanum tuberosum*). *Carbohydr. Research*, 195, 257-272.
- Sabanis, D.; Lebesi, D.; Tzia, C. **2009**. Effect of dietary fibre enrichment on selected properties of gluten-free bread. *LWT – Food Science and Technology*, 42, 1380-1389.
- Salunkhe, D.K.; Kadam, S.S. **1989**. CRC Handbook of world food legumes: nutritional chemistry processing technology and utilization. CRC Press, INC Boca Ratón: Florida, I, 5-25.
- Sandberg, A.S. **2002**. Bioavailability of minerals in legumes. *Br J Nutr.*, 88 (3), 281-285.
- Sangnark, A.; Noomhorm, A. **2004**. Chemical, physical and baking properties of dietary fiber prepared from rice straw. *Food Res. Intern.*, 37, 66-74.
- Sangronis, E.; Machado, C.; Cava, R. **2004**. Propiedades funcionales de las harinas de leguminosas (*Phaseolus vulgaris* y *Caján cajan*) germinadas. Asociación Interciencia Caracas, Venezuela. Interciencia, feb., 29 (2), 80-85.
- Santas, J.; Carbó, R.; Gordon, M.H.; Almajano, M.P. **2008**. Comparison of the antioxidant activity of two Spanish onion varieties. *Food Chem* 107: 1210-1216.
- Sasaki, T.; Matsuki, J. **1998**. Effect of wheat starch structure on swelling power. *Cereal Chem.*, 75, 525-529.
- Sathe, S.K.; Deshpande, S.S.; Salunkhe, D.K. **1985**. Dry beans of *Phaseolus*. A review. Part. 1. Chemical composition: Carbohydrates, fiber, minerals, vitamins and lipids. *Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition*. 21 (1), 41-93.
- Sathe, S.K.; Deshpande, S.S.; Salunkhe, D.K. **1982**. Functional properties of winged bean proteins. *J. Food Sci.*, 47, 503-508.
- Sathe, S.K.; Salunkhe, D.K. **1981**. Functional properties of four types of mung bean flours. *J. Sci. Food Agric.*, 32, 175-180.
- Selvendran, R.R.; Ryden, P. **1990**. Isolation and Analysis of Plant Cell Walls. *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 2, Cap. 16, 549-759.
- Selvendran, R.R.; Verena, F.V.; Verne, A. **1990**. The chemistry and properties of plant cell walls and dietary fiber. En: Kritchevsky D, Bonfield C, Anderson JW (eds), *Dietary Fiber*. New York: Plenum Press, 1-15.
- Schneeman, B.O. **1994**. Carbohydrates: Significance for energy balance and gastrointestinal function. *J. Nutr.*, 124, 1747-1753.
- Schneider, A.V.C. **2002**. Overview of the market and consumption of pulses in Europe. *Br J Nutr.*, 88, 243-250.
- Schols, H.A.; Vierhuis, E.; Baks, E.J.; Voragen, A.G.J. **1995**. Different populations of pectic hairy regions occur in apple cell walls. *Carbohydrate Research*, 275, 343-360.
- Scippa, G.S.; Rocco, M.; Iallicco, M.; Trupiano, D.; Viscosi, V.; Di Michele, M.; Arena, S.; Chiatante, D.; Scaloni, A. **2010**. The proteome of lentil (*Lens culinaris* Medik.) seeds: Discriminating between landraces. *Electroph.*, 31, 497-506.

- Seena, S.; Sridhar, K.R. **2005**. Physicochemical, functional and cooking properties of under explored legumes, *Canavalia* of the southwest coast of India. *Food Res. Int.*, 38, 803-814.
- Selvendran, R.R.; Robertson, J.A. **1994**. Dietary fiber in foods: amount and type. In *Proceedings. Metabolic and physiological aspects of dietary fiber in food*; Amado, R., Barry, J., Frolich, W., Eds.; Marsella, Francia, 11-25.
- Selvendran, R.R.; Verena, F.V.; Verne, A. **1990**. The chemistry and properties of plant cell walls and dietary fiber. En: Kritchevsky D, Bonfield C, Anderson JW (eds), *Dietary Fiber*. New York: Plenum Press, 1-15.
- Shahidi, F. **2002**. Food phenolics and their role in antioxidation and health promotion. In *Polyphenols communications*. El Hadrami, I., Eds.; Marrakech, Marruecos.; Vol I, 257-258.
- Shand, P.; Ya, H.; Pietrasik, Z.; Wanasundara, P. **2007**. Physicochemical and textural properties of heat-induced pea protein isolate gels. *Food Chem.*, 102(4), 1119-1130.
- Shiga, T.M.; Lajolo, F.M.; Filisetti, T.M.C.C. **2003**. Cell Wall polysaccharides of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) *Cienc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 23 (2): 141-148.
- Shiga, T.M.; Lajolo, F.M.; Filisetti, T.M.C.C. **2004**. Changes in the cell wall polysaccharides during storage and hardening of beans. *Food Chem.* 84, 53-64.
- Shiga, T.M.; Cordenunsi, B.R.; Lajolo, F.M. **2009**. Effect of cooking on non-starch polysaccharides of hard-to-cook beans. *Carbohydrate Polymers* 76, 100-109.
- Shrikhande, A.J. **2000**. Wine by products with health benefits. *Food Res. Int.*, 33, 469-474.
- Sies, W.; Stahl, W.; Sundquist, A.R. **1992**. Antioxidant functions of vitamins; vitamin E and C, β -carotene, and other carotenoids. In *New Views on the Function and Health Effects of Vitamins*; Savberlich, H. E., Machlin, L. Y., Eds.; Beyond Deficiency, *Annals of the New York Academy of Sciences*: New York, 7-20.
- Singh, U.; Veraputhaporan, W.; Rao, P.; Jambunathan, R. **1989**. Physicochemical characteristics of pigeonpea and mungbean starches and their noodle quality. *J. Food Sci.*, 54, 1293-1297.
- Singh, U.; Seetha, R. **1993**. Oil absorption and sensory properties of a snack food from chickpea genotypes. *J. Food. Sci.*, 58, 853-855.
- Singh, U. **2001**. Functional properties of grain legume flours. *J. Food Sci. Technol.*, 38, 191-199.
- Singleton, V.L.; Rossi, J.A. **1965**. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic phosphotungstic acid reagent. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, 144-158.
- Sirtori, E.; Isak, I.; Resta, D.; Boschini, G.; Arnoldi, A. **2012**. Mechanical and thermal processing effects on protein integrity and peptide fingerprint of pea protein isolate. *Food Chem.*, 134, 113-121.
- Sirtori, E.; Resta, D.; Brambilla, F.; Zacherl, C.; Arnoldi, A. **2010**. The effects of various processing conditions on a protein isolate from *Lupinus angustifolius*. *Food Chemistry*, 120(2), 496-504.
- Slavin, J.L. **2001**. Dietary fibre and colon cancer. In *Handbook of Dietary Fiber*; Cho, S.S.; Dreher, M.L.; Eds.; Marcel Dekker: New York, 31-45.
- Slavin, J.L. **2005**. Dietary fiber and body weight. *Nutr.*, 21, 411-418.
- Soukoulis, C.; Lebesi, D.; Tzia, C. **2009**. Enrichment of ice cream with dietary fibre: Effects on rheological properties, ice crystallisation and glass transition phenomena. *Food Chem.*, 115, 665-671.
- Sridhar, K.R.; Seena, S. **2006**. Nutritional and antinutritional significance of four unconventional legumes of the genus *Canavalia* – A comparative study. *Food Chemistry*, 99 (2): 267-288.
- Stevens, B.J.H.; Selvendran, R.R. **1984**. Hemicellulosic polymers of cabbage leaves. *Phytochemistry*, 23, 339-347.
- Stojceska, V.; Ainsworth, P.; Plunkett, A.; Ibanoglu, S. **2010**. The advantage of using extrusion processing for increasing dietary fibre level in gluten-free products. *Food Chem.*, 121, 156-164.
- Su, H.L.; Chang, K.C. **1995**. Physicochemical and sensory properties of dehydrated bean paste products as related to bean varieties. *J. Food Sci.*, 60, 764-794.
- Suzuki, H.; Sakane, I.; Hosoyama, H.; Sugimoto, A.; Nagata, K.; Tsunoda, T. **2003**. Patent: 2003/JP2003095941.
- Taiz, L.; Zeiger, E. **2006**. *Fisiologia Vegetal. Volumen II*. Ed. Universitat Jaume I.
- Tharanathan, R.N.; Mahadevamma, S. **2003**. Grain legumes, a boon to human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.*, 14, 507-518.
- Thed, S.T.; Phillips, R.D. **1995**. Changes of dietary fiber and starch composition of processed potato products during domestic cooking. *Food Chem.*, 52, 301-304.

Thibault, J.F.; Lahaye, M.; Guillon, F. **1992**. Physicochemical properties of food plant cell walls. In: Schweizer TF, Edwards CA (eds), *Dietary Fibre: Component of Food. Nutritional Function in Health and Disease*. ILSI Europe London: Springer-Verlag, 21-39.

Tolstoguzov, V.B. **1986**. In *Functional Properties of Food Macromolecules*; Mitchell, J.R., Ledward, D.A., Ed.; Elsevier Applied Science Publishers: London, 385-415.

Tovar, J.; Melito, C. **1996**. Steam-cooking and dry heating produce resistant starch in legumes. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 2642-2645.

Tovar, J.; Francisco, A.; Björck, I.; Asp, N-G. **1990**. Starch content and R-amyolysis rate in precooked legume flours. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 488-493.

Trowell, H.C. **1974**. Definition of fibre. *Lancet.*, **1**, 503.

Trowell, H.C.; Southgate, D.A.T.; Wolever, T.M.S.; Gassull, A.R.; Jenkins, D.J.A. **1976**. Dietary fibre redefined. *Lancet.*, **1**, 967-1004

Truswell, S.A. **1992**. Glycaemic index of foods. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **46**, 91-101.

Turgeon, S.; Beaulieu, M. **2001**. Improvement and modification of whey protein gel texture using polysaccharides. *Food Hydrocol.*, **15**, 583-591.

Urbano, G.; López-Jurado, M.; Hernandez, J.; Fernandez, M.; Moreu, M.C.; Frias, J.; Diaz-Pollan, C.; Prodanov, M.; Vidal-Valverde, C. **1995**. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1871-1877.

Urbano, G.; López-Jurado, M.; Frejnagel, S.; Gómez-Villalba, E.; Porres, J.; Vidal-Valverde, C. **2005**. Nutritional assessment of raw and germinated pea (*Pisum sativum* L.) protein and carbohydrate by in vitro and in vivo techniques. *Nutrition* **21**, 203-239.

Ursini, F.; Tubaro, F.; Rong, J.; Sevanian, A. **1999**. Optimization of nutrition: polyphenols and vascular protection. *Nutr. Rev.*, **57**, 241-249.

Van Damme, E.J.M.; Peumans, W.J.; Pusztai, A.; Bardocz, S. **1997**. *Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications*. Wiley. 572p.

Valiente, C.; Esteban, R.M.; Mollá, E.; López-Andréu, F.J. **1994**. Effect of roasting on dietary fibre cocoa beans. *J Food Sci* **59**: 123-124.

Vasanathan, T.; Hoover, R. **1992**. Effect of the fatting on starch structures and physicochemical properties. *Food Chem.*, **45**, 337-342.

Varela-Moreiras, G.; Ávila-Torres, J.M.; Cuadrado-Vives, C.; y col. **2008**. Valoración de la dieta española de acuerdo al Panel de Consumo Alimentario del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA). Fundación Española de la Nutrición (FEN). Madrid: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.

Vidal-Valverde, C.; Frías, J. **1991**. Legumes processing effects on dietary fiber components. *J. Food Sci.*, **56**, 1350-1352.

Vidal-Valverde, C.; Frías, J.; Esteban, R. **1992**. Dietary fibre in processed lentils. *J. Food Sci.*, **57**, 1161-1163.

Vidal-Valverde, C.; Frías, J.; Sotomayor, C.; Díaz-Pollán, C.; Fernández, M.; Urbano, G. **1998**. Nutrients and antinutritional factors in faba beans as affected by processing. *Z. Lebensm. Unters Forsch. A.*, **207**, 140-145.

Villegas, R.; Gao, Y.T.; Yang, G.; Li, H.L.; Elasy, T.A.; Zheng, W. **2008**. Legume and soy food intake and the incidence of type 2 diabetes in the Shanghai women's health study. *Am. J. Clin. Nutr.*, **87**, 162-167.

Vioque, J.; Sánchez-Vioque, R.; Pedroche, J.; Yust, M.M.; Millán, F. **2001**. Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados proteicos. *Grasas y aceites.*, **52**, 127-131.

Voutsinas, L.P.; Nakai, S. **1983**. A simple turbidimetric method for determining the fat binding capacity of proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 58-65.

Xu, B.J.; Yuan, S.H.; Chang, S.K.C. **2007**. Comparative analyses of phenolic composition, antioxidant capacity, and color of cool season legumes and other selected food legumes. *J. Food Sci.*, **72**, 167-177.

Xu, B.J.; Chang, S.K.C. **2008a**. Effects of soaking, boiling, and steaming on total phenolic content and antioxidant activities of cool season food legumes. *Food Chem.*, **110**, 1-13.

Xu, B. J.; Chang, S.K.C. **2008b**. Total phenolic content and antioxidant properties of Eclipse black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by processing methods. *J. Food Sci.*, **73**, H19-H27.

Xu, B.J.; Chang, S.K.C. **2009**. Total phenolic, phenolic acid, anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 4754-4764.

- Yamagishi, T.; Yamauchi, F.; Shibasaki, K. **1980**. Isolation and partial characterization of heatdenatured products of soybean 1S globulin and their analysis of electrophoresis. *Agric. Biol. Chem.*, 44, 1575-1561.
- Yasumatsu, K.; Sawda, K.; Moritaka, S.; Mikasi, M.; Tada, J.; Wada, T.; Ishi, K. **1972**. Whipping and emulsifying properties of soybean products. *Agric. Biol. Chem.*, 36, 719-727.
- Yeh, H.Y.; Su, N.W.; Lee, M.H. **2005**. Chemical compositions and physicochemical properties of the fiber-rich materials prepared from shoyu mash residue. *J Agric Food Chem* 53: 4361-4366.
- Yokoyama, W.H.; Hudson, C.A.; Knuckles, B.E.; Chiu, M.C.M.; Sayre, R.N.; Turnlund, J.R.; Schneeman, B.O. **1997**. Effect of barley β -glucan in durum wheat pasta on human glycemic response. *Cereal Chem* 74: 293-296.
- Yu, J.; Ahmedna, M.; Goktepe, I.; Dai, J. **2006**. Peanut skin procyanidins: composition and antioxidant activities as affected by processing. *J. Food Compos. Anal.*, 19, 364-371.
- Yu, L.; Mort, A.J. **1996**. Pectins and pectinases. In J. Visser & A. G. J. Voragen (Eds.). Amsterdam: Elsevier Science. Progress in biotechnology, 14, 79-88).
- Wakabayashi, K.; Hosono, T.; Huber, D.J. **2003**. Methyl de-esterification as a major factor regulating the extent of pectin depolymerization during fruit ripening: a comparison of the action of avocado (*Persea americana*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) polygalacturonases. *J. Plant Physiology*, 160 (6), 667-673.
- Waldia, R.S.; Singh, V.P.; Sood, D.R.; Sardana, P.K.; Mehla, I.S. **1996**. Association and variation among cooking quality traits in kabuli Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J. Food Sci. Technol.*, 33, 397-402.
- Waldron, K.W.; Esteban, R.M.; Martín-Cabrejas, M.A.; Molla, E.; Moates, G.; y col. **1995**. Improving the cooking quality of grain legumes and their products in Kenya and Cameroon. Science Research Development, Practical Information and Programmes, STD3, Agriculture, Office for Official Publications of the European Communities, Luxemburgo, ISBN 92-827-6619-5. 72-73.
- Waldron K.W; Selvendran R.R. **1990**. Composition of the cell walls of different asparagus (*Asparagus officinalis*) tissues. *Physiol. Plantarum* 80, 568-75.
- Waldron, K.W.; Selvendran, R.R. **1992**. Cell wall changes in immature asparagus stem tissue after excision. *Phytochemistry*, 31, 1931-1940.
- Wang, N.; Hache, D.W.; Toews, R.; Gawalko, E.J. **2009**. Influence of cooking and dehulling on nutritional composition of several varieties of lentils (*Lens culinaris*). *Food Science and Technology* 42: 842-848.
- Wang, N.; Hache, D.W.; Tyler, R.T.; Toews, R.; Gawalko, E.J. **2010**. Effect of cooking on the composition of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Food Research International* 43: 589-594.
- Weightman, R.M.; Renard, C.M.G.C.; Thibault, J.-F. **1994**. Structure and properties of the polysaccharides from pea hull. Part 1: Chemical extraction and fractionation of the polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 24, 139-148.
- Weightman, R.M.; Renard, C.M.G.C.; Gallanta, D.J.; Thihault, J.-F. **1995**. Structure and properties of the polysaccharides from pea hulls- II. Modification of the composition and physico-chemical properties of pea hulls by chemical extraction of the constituent polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 26, 121-128.
- Williams, P.C.; Nakoul, H.; Singh, K.B. **1983**. Relationship between cooking time and some physical characteristics in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J. Sci. Food Agric.*, 34, 492-496.
- Wolever, T.M.S. **1990**. Relationship between dietary fiber content and composition in foods and the glycemic index. *Am J Clin Nutr* 51: 72-75.
- Wu, H. **1995**. Studies on Denaturation of Proteins XIII. A Theory of Denaturation. *Adv. Prot. Chem.*, 46, 6-26.
- Zarzuolo, A.; Gálvez, J. **2005**. Fibra dietética. Gil Hernández A (ed.) Tratado de Nutrición. Acción Médica: 336-368.
- Zielinski, H.; Frías, J.; Piskula, M.; Kozłowska, H.; Vidal-Valverde, C. **2006**. The effect of germination process on the superoxide dismutase-like activity and thiamine, riboflavin and mineral contents of rapeseeds. *Food Chemistry*, 99, 516-520.
- Zulet, M.A.; Marfínez, J.A. **2001**. Dieta Mediterránea: legumbres y colesterolemia. *Rev. Chil. Nutr.*, 28, 312-320.

COLABORACIONES

Kelly Pereira Neves y Carlos Augusto Neves

Priscilla Sarmiento Fritsche y Otto Fritsche

Danielle Sarmiento y Fabio Rosa

Viviane Evangelista Santos Abreu y Tarcisio Abreu

Juliana Sarmiento Melo y Fernando Dario Coutinho

Fabiana Alencar Cavalcanti y Claudius Thadeu Cavalcanti

Luciana Gonçalves y Robinson Pereira Luzirao

Padres que me enviaron las fotografías de sus lindos hijos

María Rodríguez Garayar

Fotografías

Fábio Neves

Fotografías y Edición fotográfica

